

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN MARTÍN - TARAPOTO**

**FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS**

**DEPARTAMENTO ACADÉMICO AGROSILVO PASTORIL**



**TÉSIS**

**EFECTO DE 4 MEDIOS DE CULTIVO Y 3 DOSIS DE THIDIAZURON  
EN LA INDUCCIÓN DE EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN *Mauritia***

***flexuosa*, EN IQUITOS - PERÚ**

**PRESENTADO POR LA BACHILLER:**

**IVONE VÁSQUEZ BRIONES**

**PARA OPTAR EL TÍTULO DE:  
INGENIERO AGRÓNOMO**

**TARAPOTO - PERÚ**

**2009**



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN MARTÍN - TARAPOTO**

**FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS**

**DEPARTAMENTO ACADÉMICO AGROSILVO PASTORIL**

**ÁREA DE MEJORAMIENTO Y PROTECCIÓN DE CULTIVOS**

**TESIS:**



**EFFECTO DE 4 MEDIOS DE CULTIVO Y 3 DOSIS DE THIDIAZURON  
EN LA INDUCCIÓN DE EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN *Mauritia*  
*flexuosa*, EN IQUITOS – PERÚ.**

**PRESENTADO POR LA BACHILLER:**

**IVONE VÁSQUEZ BRIONES**

**MIEMBROS DEL JURADO**

**Ing. Dr. Jaime W. Alvarado Ramírez**  
**Presidente**

**Ing. Eybis J. Flores García**  
**Secretario**

**Ing. Elías Torres Flores**  
**Miembro**

**Ing. María E. Ruiz Sánchez**  
**Asesor**

## **DEDICATORIA**

*Con el más profundo respeto, amor y gratitud a mis padres Irma y Guillermo, por darme la vida y la felicidad de vivir en una armoniosa familia, por la formación moral e intelectual y por el incentivo incondicional que me permitió llegar hasta acá.*

*A mis hermanos, Juan y Karla, gracias por la compañía a lo largo de estos años, por el cariño y momentos tan gratificantes que compartimos juntos.*

*A Pedro Gilberto, una persona muy especial e importante en mi vida, gracias por creer en mí, por la paciencia y el amor de cada día.*

***En memoria de:***

***Angela Tello Pezo, mi querida abuelita, con quien compartí momentos maravillosos de mi niñez y adolescencia, gracias por traer al mundo a una mujer tan maravillosa como mi madre.***

***Y***

***Matilde Ramírez Flores, aquella abuelita que no conocí, pero que me dio la dicha de tener a un hombre sin igual como padre.***

## **AGRADECIMIENTO**

- ✓ A INCAGRO (Innovación y Competitividad para el Agro Peruano), por el apoyo financiero para el desarrollo de esta tesis por intermedio del convenio INIBICO – INCAGRO.
- ✓ Al Instituto Nacional de Innovación Agraria – INIA, Estación Experimental Agraria “San Roque”, por intermedio del Área de Recursos Genéticos y Biotecnología, a través del Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales, donde se desarrolló la presente tesis.
- ✓ A la Ing. María Emilia Ruíz Sánchez, por el asesoramiento del presente trabajo de investigación, por las facilidades brindadas, aportes acertados durante la ejecución y redacción del presente trabajo de investigación y por la invaluable amistad.
- ✓ Al Blgo. Marco A. León Martínez y al Ing. Henri Delgado Haya, investigadores de INIBICO.
- ✓ Al Ing. Juan Carlos Guerrero Abad, investigador del IIAP – San Martín, por el importante apoyo en el procesamiento y análisis de datos estadísticos.
- ✓ Al Ing. Sixto Imán Correa, coordinador del área de Recursos Genéticos y Biotecnología, del INIA - EEA “San Roque”, por el recibimiento cordial en sus instalaciones, por la confianza y por los valiosos consejos durante el desarrollo del presente trabajo de tesis.
- ✓ Al Ing. Sergio F. Pinedo Freyre, Responsable del Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales, del INIA - EEA “San Roque”, por la orientación directa y continua, por las sugerencias dadas y apoyo.

- ✓ A la Técnica Eloisa Celiz Morey, personal del Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales, del INIA - EEA "San Roque", por el invalorable apoyo y por la amistad.
- ✓ Al Ing. Salvador Tello , Director del Programa de Ecosistemas Acuáticos - PEA, del Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana y al Dr. Fred Chu Koog, investigador de dicha institución, por las facilidades brindadas en el laboratorio del Programa de Ecosistemas Acuáticos – IIAP.
- ✓ A Martín Ochoa y Juan Luis Alvarado, colaboradores del Programa de Ecosistemas Terrestres - PET, del IIAP, por el apoyo en las colectas del material vegetal, para el desarrollo del presente trabajo de tesis.
- ✓ A Erika Rodríguez, Mario Avalos y Richard Rivera, compañeros de trabajo en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales, del INIA – EEA "San Roque", por la amistad formada y el apoyo constante.
- ✓ A todas aquellas personas que de alguna u otra manera me brindaron su amistad y apoyo.

# ÍNDICE

<b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>II. OBJETIVOS.....</b>	<b>3</b>
2.1. GENERAL .....	3
2.2. ESPECÍFICOS .....	3
<b>III. REVISIÓN DE LITERATURA.....</b>	<b>4</b>
3.1. INFORMACIÓN DEL RECURSO AGUAJE: .....	4
3.1.1. Origen y distribución.....	4
3.1.2. Clasificación taxonómica.....	5
3.1.3. Características generales .....	6
3.2. CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES: .....	16
3.2.1. Generalidades .....	16
3.2.2. Embriogénesis somática .....	211
<b>IV. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>30</b>
4.1. UBICACIÓN DEL LUGAR EXPERIMENTAL.....	30
4.2. INSTALACIÓN DEL EXPERIMENTO .....	30
4.3. DISEÑO EXPERIMENTAL .....	31
4.3.1. Ensayo 1.....	30
4.3.2. Ensayo 2.....	30
4.4. COMPONENTES DE ESTUDIO.....	32
4.4.1. Ensayo 1 .....	32
4.4.2. Ensayo 2.....	33
4.5. COMBINACIÓN DE TRATAMIENTOS .....	35
4.5.1. Ensayo 1.....	35
4.5.2. Ensayo 2.....	35
4.6. DESCRIPCIÓN DE ENSAYOS.....	36
4.6.1. Ensayo 1.....	36
4.6.2. Ensayo 2.....	37



<b>4.7. DESARROLLO DEL ESTUDIO PARA EL ENSAYO 1 .....</b>	<b>37</b>
4.7.2. Medio de cultivo.....	37
4.7.1. Preparación de solución desinfectante .....	39
4.7.3. Preparación de material vegetal.....	39
4.7.4. Desinfección e introducción de material vegetal.....	39
4.7.5. Incubación de explantes .....	40
<b>4.8. DESARROLLO DEL ESTUDIO PARA EL ENSAYO 2 .....</b>	<b>40</b>
4.8.1. Medio de cultivo.....	40
<b>4.8. PARÁMETROS DE EVALUACIÓN.....</b>	<b>41</b>
<b>V. RESULTADOS .....</b>	<b>42</b>
<b>5.1. PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE EMBRIONES.....</b>	<b>42</b>
<b>5.2. RESULTADOS DEL PRIMER ENSAYO .....</b>	<b>46</b>
5.2.1. Determinación del porcentaje de contaminación de embriones zigóticos .....	44
<b>5.3. RESULTADOS DEL SEGUNDO ENSAYO .....</b>	<b>46</b>
5.3.1. Determinación del porcentaje de inducción de embriones zigóticos (20 dds) .....	46
5.3.2. Determinación del porcentaje de inducción de embriones zigóticos (25 dds) .....	48
5.3.3. Determinación del porcentaje de inducción de embriones zigóticos (30 dds) .....	50
5.3.4. Caracterización de la embriogénesis somática.....	52
<b>VI. DISCUSIÓN.....</b>	<b>54</b>
<b>6.1. PARA EL PRIMER ENSAYO .....</b>	<b>54</b>
6.1.1. Contaminación de embriones.....	54
<b>6.2. PARA EL SEGUNDO ENSAYO .....</b>	<b>55</b>
6.2.1. Porcentaje de inducción: .....	55
6.2.2. Caracterización de la embriogénesis somática .....	55
<b>VII. CONCLUSIONES .....</b>	<b>577</b>
<b>VIII. RECOMENDACIONES.....</b>	<b>58</b>
<b>IX. RESUMEN.....</b>	<b>59</b>
<b>X. SUMARY.....</b>	<b>60</b>



## I. INTRODUCCIÓN



La gran importancia de la Amazonía Peruana radica en su riqueza de especies animales, vegetales y su amplia extensión territorial, que es aproximadamente de 75 866 Km<sup>2</sup>, constituyéndose de esta manera en la décima parte de todos los bosques del planeta. Dentro de la flora amazónica se encuentra una inmensa gama de especies, clasificadas como maderables y no maderables. Dentro de las especies no maderables se encuentran las palmeras, que poseen una gran importancia dentro de amazonía, y que han sido amenazadas debido a la práctica innecesaria de talar el árbol con el fin de recolectar sus frutos y semillas, teniendo como resultado final una marcada erosión genética dentro de las especies de estas, un claro ejemplo de ello, es *Mauritia flexuosa* L.f. (Aguaje).

Al ocupar una superficie de más de cinco millones de hectáreas, mayormente en condiciones inundables, sin duda alguna la convierte en la palmera emblemática de la amazonía peruana. La importancia del aguaje como alimento y proveedor de otros productos no es un descubrimiento reciente, puesto que ya en 1852, el célebre científico alemán Alexander Von Humboldt lo llamó «árbol de vida» (Storti, 1993) y el coautor de la teoría de la evolución, Alfred Russel Wallace, impresionado por la extensión de las poblaciones naturales de aguaje, escribió en 1853 acerca de “un vasto templo natural que no palidece en grandeza y sublimidad frente a aquel compuesto por la Palmyra de Atenas” (Balick, 1979).

En la región amazónica, el aguaje presenta importancia antropológica para algunas tribus indígenas. (Pio Corrêa, 1926), registró que las tribus esperaban y saludaban alegremente la aparición de los frutos maduros de esta palmera realizando, en esa época, sus mejores fiestas y celebrando, simultáneamente los matrimonios.

El aguaje es una especie de alto potencial para la domesticación debido a dos factores fundamentales: la demanda actual para los frutos en formas primaria y transformada, y sus propiedades nutricionales. El aguaje ha sido considerado como la palmera de mayor importancia económica en el Perú (Padoch, 1992). Solamente en Iquitos, 5,000 familias están relacionadas a la cadena de comercialización del fruto, y se estima su consumo de 20.6 toneladas diarias (García y Pinto, 2002).

Debido a la importancia, económica, social y cultural del aguaje, el presente trabajo de investigación, busca contribuir a disminuir la pérdida de material genético de aguaje y la conservación de estos a través de la micropropagación, mediante metodologías de propagación clonal in vitro, siendo el aguaje una palmera de crecimiento único, es decir no forma brotes laterales, la propagación por meristemas apicales no representa una alternativa viable, ya que esta destruiría a la planta madre para obtener el explante. Razón por la cual se usaron embriones zigóticos como fuente de explante, así mismo se evaluaron diferentes medios de cultivo con diferentes niveles de TDZ, determinándose de esta manera el medio de cultivo óptimo para la inducción de embriogénesis somática.

## **II. OBJETIVOS**

### **2.1 General**

- ❖ Determinar el efecto de la composición mineral de los medios de cultivo en la inducción de embriogénesis somática en aguaje (*Mauritia flexuosa* L. f.), utilizando embriones zigóticos.

### **2.2 Específicos**

- ❖ Desarrollar un protocolo de introducción de embriones zigóticos de aguaje (*Mauritia flexuosa* L. f.) a condiciones de cultivo in vitro.
- ❖ Determinar el medio de cultivo óptimo para la inducción de la embriogénesis somática en aguaje (*Mauritia flexuosa* L. f.) .
- ❖ Probar el efecto del Thidiazuron [1-fenil-3-(1,2,3-tiadiazol-5-il)urea], en la inducción de embriogénesis somática en aguaje (*Mauritia flexuosa* L. f.)

### **III. REVISIÓN DE LITERATURA**

#### **3.1 INFORMACIÓN DEL RECURSO AGUAJE:**

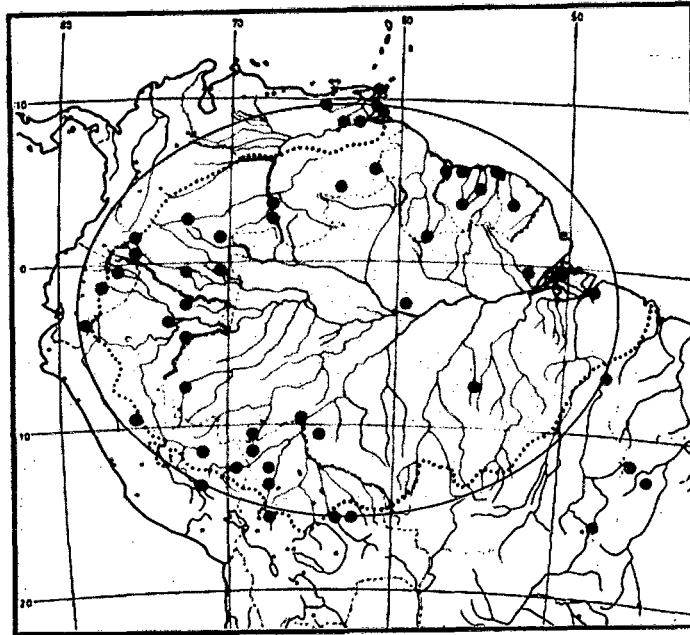
##### **3.1.1 ORIGEN Y DISTRIBUCIÓN**

El aguaje (*Mauritia flexuosa* L.f.), también llamado “buriti”, en Brasil y “moriché”, en Colombia y Venezuela, fue la primera palmera amazónica descrita por la ciencia, en 1781. Actualmente es considerada como una planta promisoría, que puede mejorar la calidad de vida de los hombres y mujeres que viven en la Amazonía.

Respecto a la distribución de *Mauritia flexuosa*, (Uhl e Dransfield, 1987 y Henderson, 1995) consideraron que se trata de una palmera de presencia restringida a América del Sur, incluyendo el este de los Andes, Colombia, Venezuela, Trinidad, las Guayanas, Ecuador, Perú, Bolivia y Brasil: En los estados del Norte y en Maranhão, Piauí, Bahía, Minas Gerais, São Paulo, Goiás e Mato Grosso (Fig. 1). Aunque crece a baja altitud, puede ser encontrado ocasionalmente en las faldas de los andes orientales hasta los mil metros de altitud.

En el Perú se reportan más de cinco millones de hectáreas de aguajales; solo en la Reserva Nacional Pacaya Samiria se han registrado aproximadamente un millón de hectáreas. En general el

aguaje, ocupa áreas abiertas e inundables, próximas a los bosques densos de la amazonía. (Henderson, 1995).



**Figura 1.** Distribución fitogeográfica de *Mauritia flexuosa* L. f., en América del Sur.

FUENTE: Henderson (1995).

### 3.1.2 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DEL AGUAJE:

**Según Cronquist (1998)**

División	: Magnoliophyta
Clase	: Liliopsida
Sub-clase	: Arecidae
Orden	: Arecales
Familia	: Arecaceae
Sub-familia	: Calamaoideae

Tribu : Lepidocaryeae  
Género : Mauritia  
Especie : *Mauritia flexuosa* L. f.

**Nombres comunes:**

En Perú: “aguaje”; en Brasil: “buriti”, “miriti”, “muriti”; en las Guianas: “awuara”, “boche” y “palmera boche”; en Venezuela, moriche; en Colombia: “canangucha”, “moriche” y “nain”; y en Bolivia, “kikyura” y “palmera real” (Henderson, 1995).

**3.1.3 CARACTERÍSTICAS GENERALES:**

**3.1.3.1 DESCRIPCIÓN BOTÁNICA**

El aguaje es una palmera arborescente de un solo tallo, sin espinas, que alcanza 25 a 30 m de altura en su estado de adulto, aunque en el Alto Río Negro se han encontrado plantas con 3 a 5 m de altura. Crece en suelos inundados o con mal drenaje, para lo cual tiene su sistema radical adaptado a este hábitat hidromórfico (Villachica, 1996)

❖ **RAÍCES:**

Las raíces primarias se originan en la base del tallo, ocasionalmente, sobre el nivel del suelo. Inicialmente, las raíces tienen geotropismo positivo hasta que alcanzan cierta



profundidad (generalmente 60 cm), a partir de la cual crecen horizontalmente. En la parte superior de estas raíces crecen otras secundarias, perpendiculares, con geotropismo negativo, llamadas neumatóforos, que tienen la función de absorber agua y nutrientes (la parte subterránea de la raíz) y de respiración (la parte aérea con neumatozonas). Las neumatozonas presentan estructura parenquimatosa formada por dos a tres capas de células alargadas y ligeramente separadas entre sí, de tal manera que el aire puede circular libremente. (Villachica, 1996)

❖ **ESTÍPITE:**

El estípite es solitario, inerme y erecto, de hasta 40 m, de altura y 30 a 60 cm., de diámetro y está constituido por un material fibroso duro (Rojas, 2000).

❖ **HOJAS:**

La corona de hojas se presenta en número de 10 a 20 por planta, con peciolo cilíndrico y largo (hasta 6 m). La disposición de las hojas le confiere la forma de una corona esférica, con las hojas muertas colgando por un período considerable antes de desprenderse (Villachica, 1996).

#### ❖ FLORES:

La planta es dioica con árboles de flores masculinas y árboles de flores femeninas, sin características que permitan diferenciar a los individuos machos de las hembras, hasta la floración. (Villachica, 1996). Las flores femeninas son de color anaranjado y se toman más brillantes y fragantes durante la etapa de reproducción, las flores masculinas también son anaranjadas, con espiguetas tipo piña, cada espigueta contiene aproximadamente 115 flores. (Del Castillo, et al., 2006).



Fig. 2: Flores femeninas de aguaje

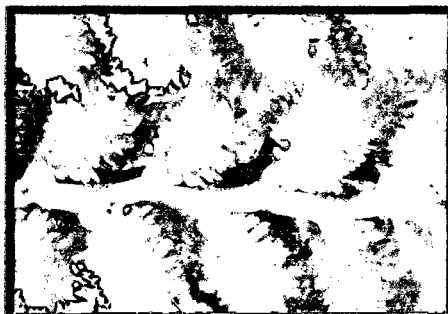


Fig. 3: Flores masculinas de aguaje

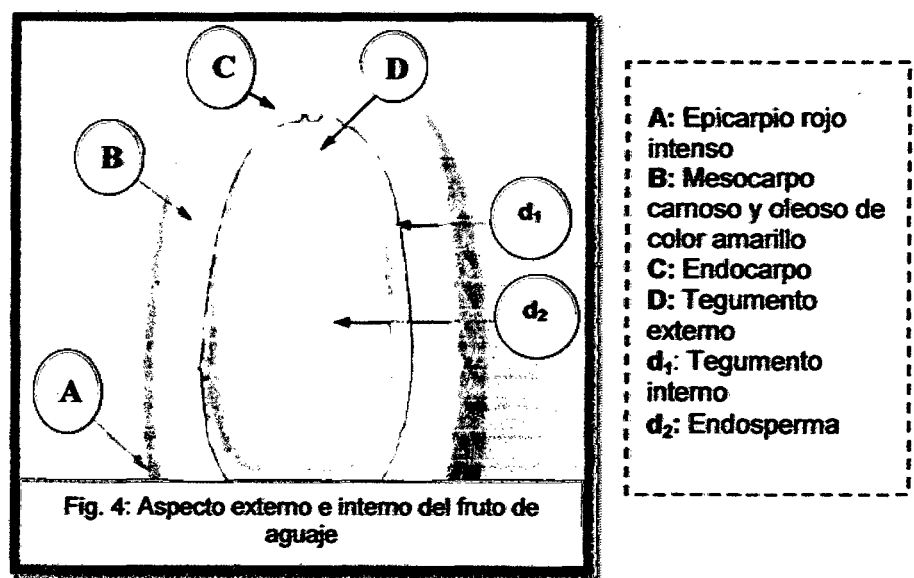
#### ❖ INFLORESCENCIA:

Las inflorescencias ocurren en número de dos a ocho, son similares en forma y tamaño, salen de las axilas de las hojas inferiores. El pedúnculo de la inflorescencia mide entre 60 y 100 cm, mientras que el raquis mide entre 70 y 140 cm, con una raquilla tipo "cola de gato". No se ha estudiado los insectos polinizadores, pero, en las flores se ha observado individuos de

la familia *Curculionidae*, *Nitidulidae*, *Staphylinidae* (Coleóptera) y *Miridae* (Hemíptera) (Villachica, 1996).

#### ❖ FRUTO:

El fruto es una drupa, de forma elíptica, con longitud entre 5 y 7 cm y diámetro entre 4 y 5 cm. El epicarpio (cáscara) es escamoso, de color rojo vino o rojo oscuro. El mesocarpio, la única parte comestible, de 4 a 6 mm de espesor, es suave, sabor agridulce y de color naranja a naranja-rojizo y representa solamente entre el 12 al 13 % del peso seco del fruto. El endocarpio (cobertura de la semilla) es suave, rico en celulosa y pobremente diferenciado. Hay una, muy raramente, de dos semillas por fruto, casi esféricas, cubiertas con una testa marrón. El peso promedio de los frutos en una inflorescencia es de 40 kg (Villachica, 1996).



Fuente: Paula-Fernandes, N. (2001).

### **3.1.3.2 BIOLOGÍA FLORAL**

El periodo de formación de una inflorescencia masculina hasta la producción de flores es de 2 a 3 meses, con floración anual ocurriendo entre los meses de febrero y agosto con los índices más altos en abril. Las flores masculinas apenas duran un día y la inflorescencia de 7 a 15 días (Storti, 1993).

El periodo de formación de una inflorescencia femenina hasta la producción de flores es aproximadamente 2 meses y la producción de frutos hasta el desprendimiento del raquis varía de 9 a 12 meses (Storti, 1993).

Cada palmera produce frutos cada 2 años y la producción a nivel de población es anual, ocurre en los meses de junio a octubre variando de 4 a 7 inflorescencias por planta (Storti, 1993).

### **3.1.3.3 SEXO**

Hay diversas opiniones en cuanto al sexo del aguaje. Para Villachica (1996), el aguaje es una planta dioica, con árboles de flores masculinas y árboles de flores femeninas, sin características que permitan diferenciar a los individuos machos de las hembras hasta la floración. Paula-Fernandes (2001), se refiere al aguaje como una planta dioica, con flores morfológicamente hermafroditas, pero fisiológicamente unisexuales.

#### **3.1.3.4 GERMINACIÓN**

Rojas (2000), menciona que sobre este tema existen opiniones totalmente divergentes, para Uhl y Dransfield (1987), la germinación del aguaje es adyacente-ligular; con el eófilo con un par de hojas divergentes, entre tanto para Villachica, (1996) la germinación es hipogea, pero para Flores (1997) es epigea.

Para Villachica (1996), la semilla separada de la pulpa debe colocarse inmediatamente en camas de aserrín porque sino pierde 50% de poder germinativo en 30 días, la germinación se inicia a los 82 días y alcanza 40% a los 101 días.

En tanto que Paula-Fernandes (2001), nos dice que la germinación del aguaje presenta momentos totalmente determinados en cuanto a la viabilidad y poder germinativo, definiendo 3 características:

- ❖ En el momento que el embrión presenta la región proximal con coloración amarilla, el cual corresponde al fruto con epicarpio de tonalidad coral, éste ya presenta capacidad germinativa.
- ❖ Los frutos con el epicarpio de coloración roja, pre – madura, son los que presentan el máximo vigor germinativo.
- ❖ Las semillas de los frutos maduros presentan estructuras morfológicas que inviabilizan o retardan la germinación.



Llegando a la conclusión de que si los frutos cosechados son para germinación, lo mas recomendable es obviar el proceso de maduración.

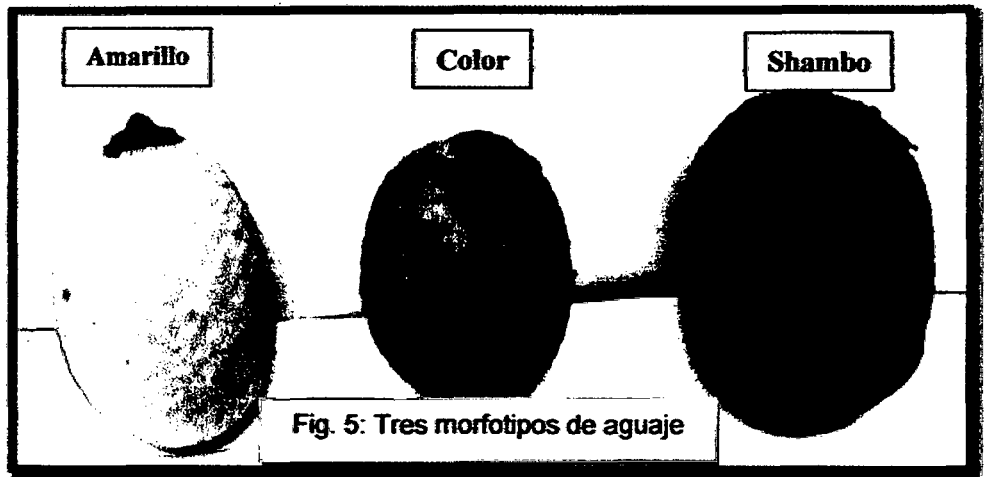
### **3.1.3.5 PROPAGACIÓN**

La forma de propagación es por semilla botánica, esta se siembra en almácigos o bolsas, para luego ser transplantadas al terreno definitivo a los 4 o 5 meses de edad cuando tengan un mínimo de 30 cm de altura. CATIE (1983) citado por Rojas (2000). Por su parte Villachica (1996), añade que durante la etapa de vivero el aguaje desarrolla mucho más cuando tiene 70% de sombra. Respecto a la viabilidad de la semilla, Flores (1997), señala que es corta, aproximadamente 30 días, la germinación es lenta y epigea y las plantas están listas para el trasplante cuando tiene como mínimo 30 cm, de altura, que se logra 4 a 5 meses después de la siembra.

### **3.1.3.6 VARIABILIDAD**

En cuanto a las palmeras, los estudios de variación individual sobre un amplio rango muestran especies sumamente variables; existiendo diferencias en tamaño del fruto, altura del árbol, rendimiento, susceptibilidad a la depredación, edad de la primera cosecha y otros factores, que son de vital importancia para futuros cultivos. En cuanto a la variabilidad del aguaje, se realizaron

muchos estudios, sin tomar referencia exacta en cuanto a especies, ecotipos, etc. Realizándose trabajos tomando solo la característica general de la planta, recientemente se realizó el primer trabajo de caracterización química tomando en cuenta tres morfotipos de aguaje, denominados: "amarillo", "color" y "shambo".



FUENTE: Vásquez-Ocmín, 2 008.

### 3.1.3.7 USOS

Esta palmera tiene múltiples usos, desde la alimentación humana hasta la industrial, su alto contenido de vitamina A, convierte al fruto del aguaje en un recurso inigualable para la dieta de niños y madres gestantes, pues ayuda a la formación y el mantenimiento de dientes sanos, de tejidos blandos y óseos, de las membranas mucosas de la piel. Esta vitamina contribuye a mejorar la visión, especialmente ante la luz tenue y también es necesaria durante la reproducción y lactancia. Ninguna fruta en la amazonía peruana es comercializada en formas tan diferentes: maduro, verde, pulpa,

“aguajina” (refresco), chupetes, helados, mermeladas y yogures.  
(Del Castillo et al., 2006).

### 3.1.3.8 COMPOSICIÓN QUÍMICA Y NUTRICIONAL

Debido a la variabilidad morfológica que presenta el aguaje, se hace necesario la diferenciación química dentro de esta especie, existiendo actualmente estudios químicos y nutricionales a partir de aguaje donde se demuestran las verdaderas potencialidades tanto de pulpa fresca como en el aceite, destacando la presencia elevadas de principales ácidos grasos,  $\beta$ - caroteno y  $\alpha$ - tocoferol.

**Cuadro 1:** Análisis de composición química en pulpa fresca de tres morfotipos de aguaje.

<b>Parámetros</b>	<b>Amarillo</b>	<b>Color</b>	<b>Shambo</b>
	Promedio $\pm$	Promedio $\pm$ DS	Promedio $\pm$ DS
<b>Humedad</b>	62.85 $\pm$ 0.04	62.71 $\pm$ 0.69	63.96 $\pm$ 0.02
<b>Cenizas</b>	2.94 $\pm$ 0.02	3.00 $\pm$ 0.02	2.05 $\pm$ 0.03
<b>Aceites</b>	22.80 $\pm$ 0.26	21.30 $\pm$ 0.53	25.20 $\pm$ 0.10
<b>Proteínas</b>	3.90 $\pm$ 0.10	6.50 $\pm$ 0.10	6.10 $\pm$ 0.10
<b>Zinc</b>	0.58 $\pm$ 0.00	0.70 $\pm$ 0.00	0.90 $\pm$ 0.00
<b>Calcio</b>	137.79 $\pm$ 1.31	89.14 $\pm$ 1.17	132.49 $\pm$ 0.64
<b>Cobre</b>	0.28 $\pm$ 0.00	0.69 $\pm$ 0.00	0.43 $\pm$ 0.00
<b>Sodio</b>	8.18 $\pm$ 0.03	9.20 $\pm$ 0.03	20.76 $\pm$ 0.19
<b>Magnesio</b>	44.12 $\pm$ 0.04	44.08 $\pm$ 0.02	98.61 $\pm$ 0.06
<b>Manganeso</b>	10.96 $\pm$ 0.15	7.72 $\pm$ 0.03	6.62 $\pm$ 0.01

FUENTE: Vásquez-Ocmín, (2008)



**Cuadro 2:** Análisis de composición química en los aceites de tres morfotipos de aguaje.

<b>Parámetros</b>	<b>Amarillo</b>	<b>Color</b>	<b>Shambo</b>
	Promedio $\pm$ DS	Promedio $\pm$ DS	Promedio $\pm$ DS
<b>Índice de Yodo</b>	70.99 <sup>a</sup> $\pm$ 0.28	70.38 <sup>a</sup> $\pm$ 0.11	70.17 <sup>b</sup> $\pm$ 0.31
<b>Índice de Saponificación</b>	191.34 <sup>a</sup> $\pm$ 0.28	186.25 <sup>b</sup> $\pm$ 0.22	194.89 <sup>c</sup> $\pm$ 0.41
<b>Punto de fusión</b>	11.0 <sup>a</sup> $\pm$ 1.0	12.0 <sup>a</sup> $\pm$ 1.0	10.3 <sup>a</sup> $\pm$ 0.57
<b>Índice de Peróxido</b>	11.12 <sup>a</sup> $\pm$ 5.36	10.0 <sup>a</sup> $\pm$ 1.0	12.46 <sup>a</sup> $\pm$ 0.49
<b>Índice de Acidez</b>	2.69 <sup>a</sup> $\pm$ 0.19	2.13 <sup>a</sup> $\pm$ 0.40	3.54 <sup>b</sup> $\pm$ 0.32
<b>Ac. Palmítico</b>	19.61 <sup>a</sup> $\pm$ 0,41	20.26 <sup>a</sup> $\pm$ 0,11	21.68 <sup>b</sup> $\pm$ 0,18
<b>Ac. Palmitoléico</b>	0.15 <sup>a</sup> $\pm$ 0,01	0.28 <sup>b</sup> $\pm$ 0,00	0.27 <sup>b</sup> $\pm$ 0,00
<b>Ac. Esteárico</b>	1.57 <sup>a</sup> $\pm$ 0,02	1.40 <sup>b</sup> $\pm$ 0,01	1.86 <sup>c</sup> $\pm$ 0,00
<b>Ac. Oléico</b>	75.63 <sup>a</sup> $\pm$ 0,31	75.02 <sup>b</sup> $\pm$ 0,10	71.67 <sup>c</sup> $\pm$ 0,10
<b>Ac. Linoleico</b>	2.19 <sup>a</sup> $\pm$ 0,25	2.29 <sup>a</sup> $\pm$ 0,01	3.70 <sup>a</sup> $\pm$ 0,01
<b>Ac. Linolénico</b>	0.82 <sup>a</sup> $\pm$ 0,06	0.72 <sup>a</sup> $\pm$ 0,02	0.80 <sup>a</sup> $\pm$ 0,08
<b><math>\beta</math>- caroteno (ug/g)</b>	324.42 <sup>a</sup> $\pm$ 0.71	264.60 <sup>b</sup> $\pm$ 0.44	283.57 <sup>c</sup> $\pm$ 0.48
<b><math>\alpha</math>- tocoferol (mg/L)</b>	683.35 <sup>a</sup> $\pm$ 0.46	685.81 <sup>b</sup> $\pm$ 1.04	677.58 <sup>c</sup> $\pm$ 0.63

FUENTE: Vásquez-Ocmín, (2008)

## **3.2 CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES:**

### **3.2.1. GENERALIDADES:**

#### **3.2.1.1 DEFINICIÓN**

El cultivo de tejidos *in vitro* comprende, de forma general, un grupo heterogéneo de técnicas que posibilitan el cultivo de partes separadas de una planta como células (células aisladas y protoplastos), tejidos (médula de tallo, hojas, etc.) y órganos (ápices, semillas, etc.) denominado “explante”, en un medio de cultivo aséptico, y que bajo la influencia de las sustancias constituyentes de este medio de cultivo y demás factores, como; el ambiente de incubación, se induce el crecimiento y desarrollo de una planta completa (Delgado y Rojas, 1999).

Los objetivos perseguidos con la utilización del cultivo *in vitro*, son numerosos y diferentes. Sintetizándose así en: a) estudios básicos en fisiología, genética, bioquímica y ciencias afines; b) bioconversión y producción de compuestos útiles; c) incremento de la variabilidad genética; d) obtención de plantas libres de patógenos; e) propagación de plantas y f) conservación e intercambio de germoplasma (Roca y Mroginski, 1991).

De acuerdo a lo antes descrito, para lograr el establecimiento de cultivos a condiciones in vitro se deben tener consideraciones genéricas acerca de los factores directamente influyentes como: a) explante; b) condiciones de asepsia; c) medios de cultivo y d) condiciones ambientales de incubación, dada que la interacción de estos factores determinará la respuesta que se obtenga in vitro y posteriormente en el campo.

❖ **EXPLANTE:**

La elección de un explante apropiado constituye el primer paso para el establecimiento de los cultivos; en primera instancia, dicha elección esta determinada por el objetivo perseguido y la especie vegetal utilizada (Roca y Mroginski, 1991).

Por otro lado, la respuesta de un explante está en función del genotipo utilizado (Flores y Delgado, 1985).

❖ **ASEPSIA:**

Es la condición estéril sin contaminación por cualquier tipo de microorganismo (Echenique et al., 2004).

La falta de cuidados en el establecimiento de un cultivo, puede crear un ambiente ideal para el desarrollo y proliferación de hongos y bacterias. Muchos factores han

sido señalados como responsables de la contaminación, y todos ellos tienen como común denominador a las deficiencias en alguna etapa del proceso: a) esterilización del medio de cultivo, b) desinfección del explante c) manipulación de los materiales durante el proceso de inoculación. (Delgado y Rojas, 1 999).

❖ **MEDIO DE CULTIVO:**

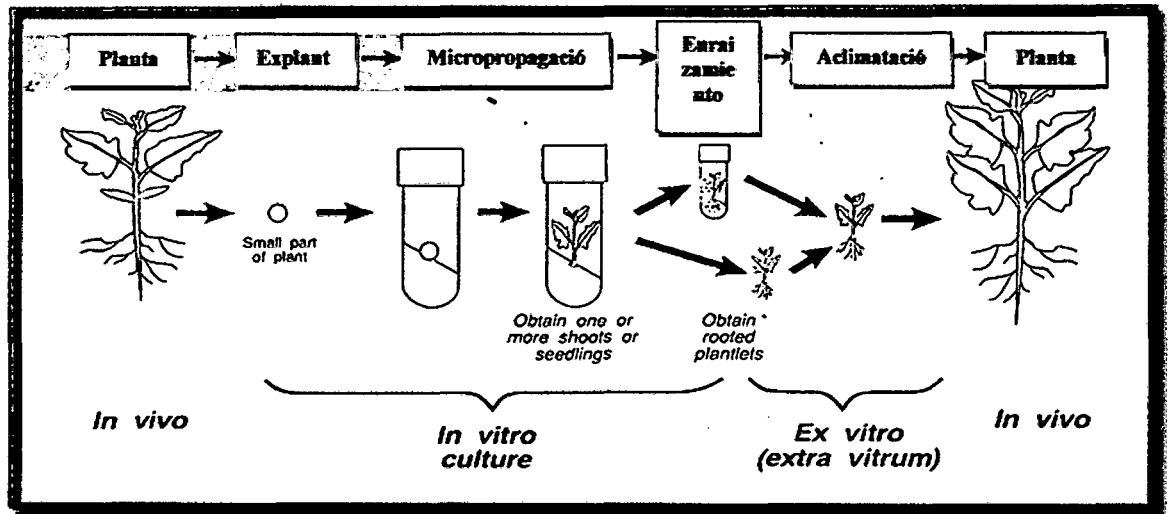
Consiste de una solución de sales minerales suplementadas con elementos de mayor a menor concentración, necesarios para el crecimiento total de las plantas, adicionándose a este medio; vitaminas, aminoácidos, carbón activado, etc. (George y Sherrington, 1993).

❖ **INCUBACIÓN:**

La condición de asepsia en esta área es fundamental, debido a que en este ambiente los cultivos inician su crecimiento y desarrollo y permanecen por periodos de tiempo prolongados. Estos cultivos pueden ser acondicionados de dos maneras: a) en incubadoras, donde se ejerce un control estricto de luz y temperatura y b) en estantes de metal o madera, donde las

condiciones óptimas de luz, temperatura y humedad relativa deben ser reguladas (Delgado y Rojas, 1999).

### FASES DEL CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES



Fuente: George, (1993).

#### 3.2.1.3 FACTORES DE INFLUENCIA:

Del cultivo de cualquier explante pueden esperarse varias respuestas: a) que el explante no evidencie ninguna respuesta morfológica observable, aún cuando puedan ocurrir modificaciones bioquímicas. b) que el explante presente contaminación resultante de microorganismos exógenos o endógenos. c) que el explante presente oxidación (fenolización). d) que el explante evidencie la formación de callos. e) que el explante evidencie la formación de callos y consecutivamente un proceso morfogénico indirecto. f) que el explante evidencie un proceso morfogénico directo (Delgado y Rojas, 1999)

**Explante → Cultivo → Respuesta**

- a) Sin respuesta
- b) Cultivo contaminado
- c) Cultivo fenolizado
- d) Inducción de callo
- e) Regeneración

#### **3.2.1.4 ESTRATEGIAS PARA LA PROPAGACIÓN CLONAL**

Según (Roca y Mroginski, 1991), nos dice que:

Existen varias vías generales para la multiplicación clonal, entre ellas están:

- ❖ **La multiplicación de brotes de yemas terminales, axilares o laterales.** El punto de inicio en este caso pueden estar en los meristemas, las puntas de los brotes, las yemas, los nudos, o los brotes de las yemas en raíces.
- ❖ **La organogénesis directa.** En este caso la formación del brote adventicio o de la raíz ocurre en el explante de un órgano o en alguna parte escindida de la planta.
- ❖ **La organogénesis indirecta.** La formación del brote adventicio o de la raíz, ocurre en este caso en el callo, es obvio que el callo se deriva inicialmente de un órgano, tejido o de alguna parte escindida de la planta.

- ❖ **La embriogénesis somática.** Los embriones pueden formarse directamente en el explante primario, o indirectamente de las células cultivadas en suspensión o un medio semisólido.
- ❖ **Los órganos de perennidad.** Formados en cultivos asépticos.
- ❖ **El microinjerto.** Es la pequeña porción de explante sobre puesto sobre un patrón en condiciones in vitro.
- ❖ **El cultivo de embriones y esporas.** Establecimiento in vitro de embriones de semilla sexual, y el cultivo de esporas es conocido como cultivo de células haploides (esporofitos)

### **3.2.2. EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA**

#### **3.2.2.1 INTRODUCCIÓN:**

Los primeros estudios sobre la embriogénesis somática fueron realizados, independientemente, por Steward et al., (1958), y Reinert (1958), utilizando callos de zanahoria derivados de raíces de almacenamiento. Desde entonces se ha demostrado que un gran número de especies y familias

son capaces de inducir embriogénesis somática. Tisserat et al., (1979), reportó la formación de embriones somáticos en 32 familias, 81 géneros y 132 especies.

#### **3.2.2.2 DEFINICIÓN:**

La embriogénesis somática es quizás la más impresionante y espectacular demostración de la persistencia de la totipotencia celular en las plantas superiores y la obtención de plantas enteras a través de embriones somáticos inducidos en sistemas in vitro (Reinert et al., 1977).

La embriogénesis somática, es el proceso mediante el cual, las células somáticas (no reproductoras) haploides o diploides se transforman en plantas diferenciadas a través de etapas embriológicas características. El proceso puede ocurrir en forma natural en muchas especies (Salisbury y Ross, 1994).

#### **3.2.2.3 PADRONES Y ORIGEN DE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA:**

Los avances en el conocimiento de los mecanismos que envuelven la embriogénesis somática, dependen de un mayor sentido de los procesos básicos de este fenómeno, y de la corroboración de que existen por lo menos dos





categorías de embriogénesis que ocurren in vitro (Guerra y Handro, 1988).

- ❖ **Embriogénesis directa.-** En el cual los embriones somáticos se originan de los tejidos, sin la previa formación de callos.
- ❖ **Embriogénesis indirecta.-** En la cual existe un estadio intermediario de callo, previo a la formación de embriones.

#### **3.2.2.4 EMBRIOGÉNESIS ZIGÓTICA Y EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA**

Aún cuando existe un modelo morfológico básico de embriogénesis zigótica entre especies vegetales, una considerable variación ha sido observada cuando el estudio ha sido realizado de manera detallada (Steeves y Sussex, 1989).

En dicotiledóneas, por ejemplo, la especie modelo utilizada ha sido *Arabidopsis thaliana* (Cruciferae), en esta especie el proceso es bastante rápido, completándose entre los 11 y 12 días, después de la fertilización, y la semilla madura a los 14 días. Después de la fertilización, el cigoto sufre una división

transversal asimétrica hasta formar una célula apical, esta se divide, primero por dos divisiones verticales en ángulo recto y luego por una división transversal, hasta formar una estructura con ocho células isodiamétricas, el estado “octante”, en el cual las células del propio embrión se organizan en dos hileras. La fila superior de células formará el meristema apical y los cotiledones y la fila inferior el hipocótilo. El estadio **globular** de desarrollo del embrión, ocurre 2 – 3 días después de la fertilización, luego sigue el estadio de **corazón**, 3-4 días después continúa el estadio de **torpedo**, y finalmente resulta el estadio de **embrión zigótico maduro** (Lindsey y Topping, 1993).

En monocotiledóneas, la especie modelo utilizada ha sido *Zea mays*. El desarrollo del embrión zigótico, respecto a *Arabidopsis thaliana*, exhibe no solamente marcadas diferencias en tamaño y peso, sino también en la complejidad de su desarrollo morfológico hasta su maduración, la que se alcanza entre 40-50 días, después de la fertilización. La primera división del cigoto también es asimétrica, produciendo una célula apical pequeña y una célula basal más grande. La célula apical se divide verticalmente, pero las divisiones subsiguientes, a diferencia de *Arabidopsis* son predominantemente asimétricas,

resultando en la formación de un embrión en forma de garrote, con un suspensor apenas distinguible por la gran vacuolización de sus componentes celulares. Después de 9 días de la fertilización, se observan los primeros signos de diferenciación intra-embriónica, 20 días después ocurren posteriores divisiones celulares, el ápice caulinar y radicular se encuentran claramente diferenciados, con un relativamente largo suspensor en el lado inferior y un escutelo semejante a un escudo, el que representa a un cotiledón, característico en el maíz y las monocotiledóneas en general (Lindsey y Topping, 1993).

El desarrollo morfológico y temporal de los embriones somáticos es muy semejante al de los embriones zigóticos. Tomando como modelo la embriogénesis somática en zanahoria, el primer estadio reconocible es el globular, a partir del cual el embrión somático inicia su crecimiento 5 a 7 días después del cambio a un medio de cultivo sin auxinas, después de 2 a 3 días de crecimiento isodiamétrico, se observa un estadio oblongo, cambiando al estadio de corazón. La transición globular-corazón, es claramente marcada por un mayor crecimiento de los cotiledones. Este proceso continúa a través de los estadios de torpedo y planta en miniatura (Delgado y Rojas, 1999).

No obstante que los embriones somáticos desarrollan fuera del encierro físico y del contexto informativo del tejido maternal (como en los embriones zigóticos), la similitud que exhiben respecto al desarrollo de los embriones sexuales, resulta extremadamente asombrosa (Zimmerman, 1993).

#### **3.2.2.5 FASES DE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA**

Las fases por las cuales se realiza la embriogénesis somática son tres:

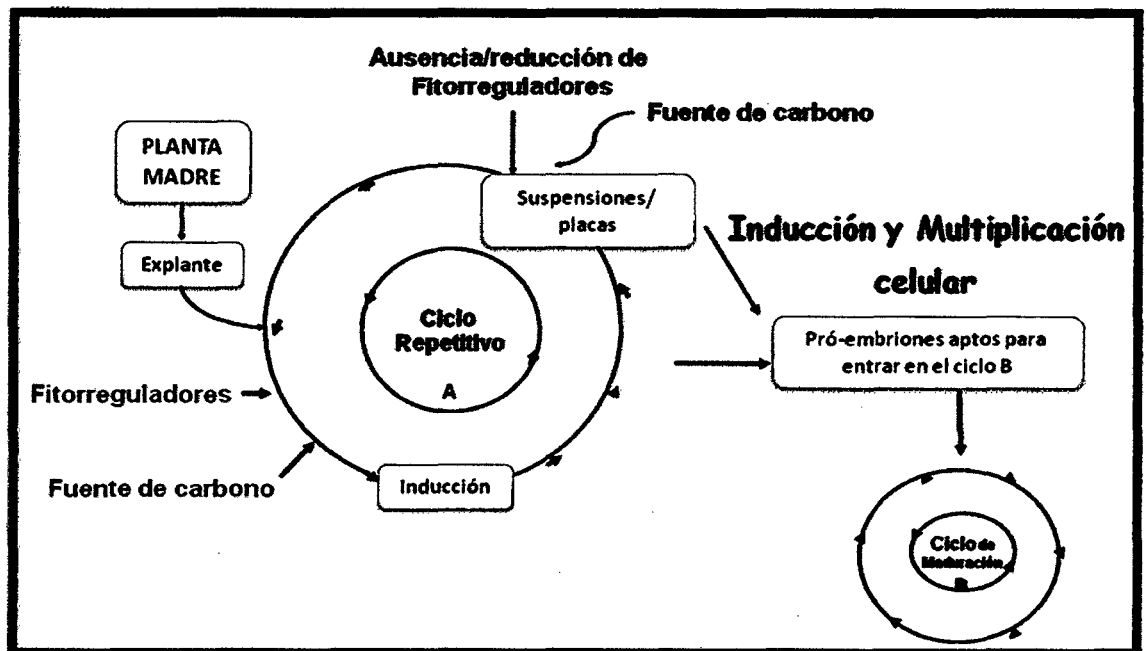
- ❖ **Inducción de la embriogénesis somática.** Esta fase comprende la selección y desinfestación del explante, así como su inoculación en el medio de cultivo, llamado también primario o de inducción. Este medio de cultivo puede variar entre una especie a otra e inclusive entre genotipos de una misma especie. Un hecho notable en este medio de cultivo primario es la presencia de auxinas, destacando el 2,4 D, y en menor proporción el AIA y ANA (Delgado y Rojas, 1999).
- ❖ **Maduración de embriones somáticos:** En la mayoría de casos, después de haber logrado la inducción del callo embriogénico, es necesario transferirlo a un segundo medio de cultivo. El desarrollo normal de un

embrión en esta fase del proceso es como sigue:  
globular, acorazonada y torpedo (Chée y Canttlife, 1989; Delgado, 1995).

❖ **Desarrollo y germinación de embriones somáticos:**

En esta fase, el embrión somático, que ha alcanzado el estadio de torpedo, se convierte en planta íntegra potencialmente capaz de ser transferida con éxito a condiciones de campo (Delgado y Rojas, 1999).

### FASES DE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA



FUENTE: Guerra, (1 988).

### 3.2.2.6 FACTORES QUE CONTROLAN LA EMBRIOGENESIS

#### SOMÁTICA:



- ❖ **Explante.** El estadio de desarrollo y el estado fisiológico de los tejidos del explante a usarse, son los aspectos más importantes para el comienzo de cultivos embriogénicos (Guerra y Handro, 1988). Para las monocotiledóneas, en general, las regiones con células en división activa parecen más adecuadas como fuentes de explante (Ammirato, 1983) Cuando los embriones inmaduros son utilizados como explantes, todos sus tejidos presentan condición meristemática activa, y por lo tanto, aptitudes embriogénicas (Guerra y Handro, 1988).
- ❖ **Nitrógeno.-** La adición de nitrógeno en forma amoniacal induce una mayor frecuencia de embriogénesis somática (Halperin y Wetherell, 1965).

La presencia de nitrógeno en forma de Nitrato de amonio, es necesario para la diferenciación de los embriones somáticos (Guerra y Handro, 1988).

Una razón fundamental para la importancia del nitrógeno reducido en el metabolismo vegetal, se debe a la

activación del metabolismo nitrogenado, que incluye la actividad de la enzima nitrato y nitrito reductasa, donde el amonio sigue la ruta primaria en el cual este ion es incorporado en los compuestos orgánicos (Grey, 1987).

- ❖ **Fitorreguladores.** Substancias tanto de origen natural como sintetizado en laboratorio que determinan respuestas a nivel de crecimiento, metabolismo ó desarrollo en la planta. Se conocen cinco grupos de compuestos que ocurren en forma natural, cada uno de los cuales exhibe propiedades fuertes de regulación del crecimiento en plantas, y cada uno con su estructura particular y activos a muy bajas concentraciones dentro de la planta: Auxinas, Citocininas, Giberelinas, Etileno y Ácido abscísico (Saavedra, 2008).



## **IV. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **4.1 UBICACIÓN DEL LUGAR EXPERIMENTAL:**

El presente trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Cultivos de Tejidos Vegetales de la Estación Experimental Agraria de "San Roque" perteneciente al Instituto Nacional de Investigación Agraria (INIA), Iquitos. Se inició el 01 de Abril del 2008, concluyéndose el 30 de Diciembre del mismo año.

#### **Ubicación Política**

Lugar	:	E.E.A. "San Roque"
Distrito	:	San Juan Bautista
Provincia	:	Maynas
Departamento	:	Loreto

#### **Ubicación geográfica**

Latitud sur	:	03° 45' 05"
Latitud oeste	:	73° 14' 40"
Altitud	:	126 m.s.n.m
Clima	:	bh-T bosque Húmedo Tropical.

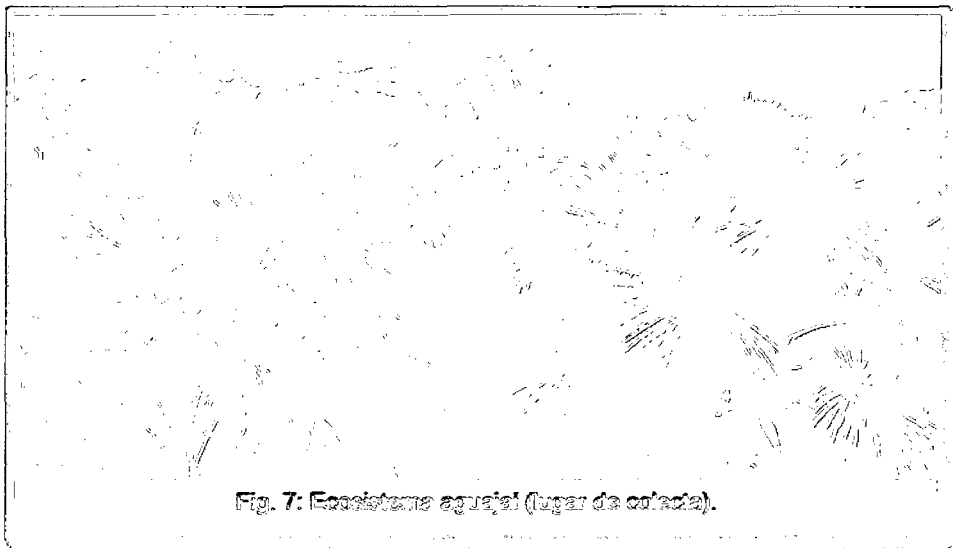
### **4.2 INSTALACIÓN DEL EXPERIMENTO:**

Para la instalación de cada ensayo se comenzó por realizar la colecta de frutos de aguaje, en el estadio de 5º mes de cuajado (sin madurar),

determinándose el punto de colecta para el desarrollo de todos los ensayos incluidos en este trabajo, como sigue:

Lugar : Km. 17.5 Carretera Iquitos – Nauta

Ubicación : 18 M 0381821 UTM 9567652



#### 4.3 DISEÑO EXPERIMENTAL

El desarrollo de la investigación comprendió de dos ensayos secuenciales, realizándose 3 repeticiones para cada uno de estos.

Ensayo 1: Consistió en la determinación del tipo de desinfección adecuado del explante, realizándose 2 pruebas, la primera Sin fungicida + 0.5 NaOCl + 0.5 mg/l Tween y la segunda con fungicida + 0.5 NaOCl + 0.5 mg/l Tween. Se utilizó un DCA con arreglo factorial de 2 x 2.

**Ensayo2:** Consistió en la determinación del efecto de las sales minerales de 4 medios de cultivo (Murashige & Skoog, Murashige & Skoog a ½ de concentración, Woody Plant Medium y Heller) y 4 dosis de TDZ (0,000, 0,001, 0,003 y 0,005 mg/l) en el porcentaje de inducción en días. Se utilizó un DCA con arreglo factorial de 4 x 4.

#### 4.4 COMPONENTES DE ESTUDIO.

**Ensayo 1:** Determinación de un tratamiento de desinfección de semillas de aguaje, usando un fungicida (Vitavax) como variante y días después de la siembra (5 y 15), determinándose así el porcentaje de contaminación.

**Cuadro 3:** Efecto de 2 tratamientos de desinfección en semillas de aguaje.

FACTORES	NIVELES	
Tratamiento preliminar (A)	Composición	
	Sin fungicida + 0.5 NaOCl + 0.5 mg/l Tween	Con fungicida + 0.5 NaOCl + 0.5 mg/l Tween
Tiempo (B)	Días después de la siembra	
	5	15

Para este ensayo se utilizó un diseño completamente al azar con arreglo factorial de 2 x 2, estuvo constituido por 2 tratamientos con 16 repeticiones. La unidad experimental estuvo constituida por un tubo de ensayo de 25 x 150 mm con un embrión inmaduro.

$$\text{Modelo Matemático: } Y_{k(ij)} = \mu + \lambda_i + \beta_j + \lambda\beta_{ij} + \xi_{k(ij)}$$

Donde:

$Y_{ij}$  = Resultado de una unidad experimental

$M$  = Media general

$\lambda_i$  = Efecto principal del factor A

$\beta_j$  = Efecto principal del factor B

$\lambda\beta_{ij}$  = Efecto de la interacción AB

$\xi_{k(ij)}$  = Error de la unidad experimental

**Cuadro 4:** Análisis de varianza para el experimento DCA con arreglo factorial 2x2.

Fuente de Variabilidad	Grado de Libertad
Tratamientos	$t-1=3$
F(A)	$p-1=1$
F(B)	$q-1=1$
AB	$(p-1)(q-1)=1$
Error	$(r-1)(pq)=60$
<b>Total</b>	$pqr - 1=63$

**Ensayo 2:** Efecto de 2 factores: Sales minerales de 4 Medios de cultivo y concentración hormonal (TDZ) en 4 concentraciones en el porcentaje de inducción en el desarrollo de la embriogénesis somática en los tratamientos en estudio.

**Cuadro 5:** Efecto de las sales minerales de 4 medios de cultivo y 4 dosis de TDZ, en la inducción de embriogénesis somática en aguaje.

FACTORES	NIVELES			
Medios de cultivo(A)	Composición química			
	M&S (a <sub>1</sub> )	M&S ½ (a <sub>2</sub> )	WPM (a <sub>3</sub> )	Heller (a <sub>4</sub> )
Thidiazuron (B)	Concentración (mg/l)			
	0.000 (b <sub>1</sub> )	0.001 (b <sub>2</sub> )	0.003 (b <sub>3</sub> )	0.005(b <sub>4</sub> )

Para este ensayo se usó un diseño completamente al azar con arreglo factorial de 4 x 4, estuvo constituido por 16 tratamientos con 10 repeticiones. La unidad experimental estuvo constituida por un tubo de ensayo de 25 x 150 mm con un embrión zigótico inmaduro.

Modelo Matemático:  $Y_{k(ij)} = \mu + \lambda_i + \beta_j + \lambda\beta_{ij} + \xi_{k(ij)}$

**Cuadro 6:** Análisis de varianza para el experimento DCA con arreglo factorial 4 x 4.

Fuente de Variabilidad	Grado de Libertad
Tratamientos	t-1=15
F(A)	p-1=3
F(B)	q-1=3
AB	(p-1) (q-1)=9
Error	(r-1) (pq)=144
Total	Pqr – 1=159

**4.5 COMBINACIÓN DE TRATAMIENTOS**

**Ensayo 1:** Modelo de tratamientos en cuanto a 2 tratamientos preliminares del explante y su respuesta en tiempos diferentes.

**Cuadro 7:** Combinación y descripción de los tratamientos para desinfección.

<b>Interacciones</b>	<b>Tratamientos preliminares / tiempos</b>	<b>Tratamiento preliminar (A)</b>	<b>Tiempos (B)</b>
T1	A1B1	Sin fungicida	5 dds
T2	A1B2	Sin fungicida	15 dds
T3	A2B1	Con fungicida	5 dds
T4	A2B2	Con fungicida	15 dds

**Ensayo 2:** Combinaciones de tratamientos para la evaluación de inducción, en el desarrollo de la embriogénesis somática en tratamientos puestos en estudio.

**Cuadro 8:** Combinación y descripción de los tratamientos para inducción de embriogénesis somática.

<b>Interacciones</b>	<b>4 Medios de cultivo (A) / 4 Dosis TDZ (B)</b>	<b>Medios de cultivo (A)</b>	<b>Dosis TDZ (mg/L) (B)</b>
T <sub>1</sub>	A <sub>1</sub> B <sub>1</sub>	M&S	0.000
T <sub>2</sub>	A <sub>1</sub> B <sub>2</sub>	M&S	0.001
T <sub>3</sub>	A <sub>1</sub> B <sub>3</sub>	M&S	0.003
T <sub>4</sub>	A <sub>1</sub> B <sub>4</sub>	M&S	0.005
T <sub>5</sub>	A <sub>2</sub> B <sub>1</sub>	M&S 1/2	0.000
T <sub>6</sub>	A <sub>2</sub> B <sub>2</sub>	M&S 1/3	0.001
T <sub>7</sub>	A <sub>2</sub> B <sub>3</sub>	M&S 1/4	0.003
T <sub>8</sub>	A <sub>2</sub> B <sub>4</sub>	M&S 1/5	0.005
T <sub>9</sub>	A <sub>3</sub> B <sub>1</sub>	WPM	0.000
T <sub>10</sub>	A <sub>3</sub> B <sub>2</sub>	WPM	0.001
T <sub>11</sub>	A <sub>3</sub> B <sub>3</sub>	WPM	0.003
T <sub>12</sub>	A <sub>3</sub> B <sub>4</sub>	WPM	0.005
T <sub>13</sub>	A <sub>4</sub> B <sub>1</sub>	Heller	0.000
T <sub>14</sub>	A <sub>4</sub> B <sub>2</sub>	Heller	0.001
T <sub>15</sub>	A <sub>4</sub> B <sub>3</sub>	Heller	0.003
T <sub>16</sub>	A <sub>4</sub> B <sub>4</sub>	Heller	0.005

## 4.6 DESCRIPCIÓN DE ENSAYOS

### 4.6.1 ENSAYO 1

Se realizaron 2 pruebas de tratamiento preliminar del explante, usando 2 variables, la primera fue NaOCl (0.5%) + 5 mg/l Tween y el siguiente fue fungicida (0.5 mg/l) 24 horas antes de la siembra + NaOCl (0.5%) + 5 mg/l Tween, tomándose datos de porcentaje de contaminación a los 5 dds y a los 15 dds respectivamente.

#### **4.6.2 ENSAYO 2**

Se realizó una prueba de inducción de embriogénesis somática usando como explantes embriones zigóticos de aguaje en el 5º mes de cuajado (sin madurar), con 16 tratamientos ( $T_1$ ,  $T_2$ ,  $T_3$ ,  $T_4$ ,..... $T_{16}$ ) y 10 repeticiones, probando la interacción de 2 factores: Composición mineral de 4 medios de cultivo y concentración de TDZ en 4 niveles (0.00; 0.001; 0.003 y 0.005 mg/l), consecutivamente se evaluó el proceso de inducción de callos o células pro embriogénicas, cada 5 días a partir del día 20.

#### **4.7 DESARROLLO DEL ESTUDIO PARA EL ENSAYO 1**

##### **4.7.1 Medio de cultivo**

Se utilizaron 4 medios de cultivo M&S (1962), M&S  $\frac{1}{2}$ , Woody plant Medium (WPM) y Medio Heller, suplementado con Vitaminas del medio M&S para los 4 medios, 20.0 g/l de glucosa, 2 g/l de carbón activado, 50.00 mg/l de 2,4-D y 2.0 g/l de phytigel como base, y 4 diferentes concentraciones de thidiazurón (0.000, 0.001, 0.003 y 0.005 mg/l)

#### **PROTOCOLO PARA LA PREPARACIÓN DE 4 MEDIOS DE CULTIVO + 2,4D + 4 DOSIS TDZ**

- ❖ Separar y etiquetar 4 matraces Erlenmeyer de 500 ml, de acuerdo al medio de cultivo correspondiente a cada uno. (Murashige & Skoog completo, Murashige & Skoog  $\frac{1}{2}$  cc, Woody Plant Medium y Heller)



- ❖ En cada uno dispensar las soluciones stock de acuerdo al volumen requerido siguiendo el orden establecido para cada medio de cultivo (indicado en la tabla N)
- ❖ Seguidamente agregar la solución V (vitaminas), sacarosa, carbón activado y 2,4 D.
- ❖ Medir y ajustar el pH a 5.8.
- ❖ Agregar phytigel y enrazar a 400 ml.
- ❖ Mezclar todos los componentes con la ayuda del agitador magnético.
- ❖ A cada matraz, separar el contenido en 4 partes de 100 ml cada uno, antes de enrazar a 100 ml agregar la dosis de TDZ para cada tratamiento y finalmente enrazar a 100 ml.
- ❖ Dispensar en tubos de ensayo la cantidad de 10 ml/tubo de ensayo, utilizando la pipeta de 10 ml.
- ❖ Los tubos se dividieron en 4 gradillas, conteniendo cada una de esta 40 tubos, para cada medio de cultivo, diferenciando las dosis de TDZ, por el color de la tapa:
  - Tapa roja = 0,000 mg/l TDZ
  - Tapa verde = 0,001 mg/l TDZ
  - Tapa amarilla = 0,003 mg/l TDZ
  - Tapa azul = 0,005 mg/l TDZ
- ❖ Autoclavado a 15 lb/20 minutos.

#### **4.7.2 Preparación de solución desinfectante**

Se preparó 1000 ml de una solución desinfectante al 0.5% de NaOCl + 0.5 mg/l de tween.

#### **4.7.3 Preparación del material vegetal**

Se colectaron 200 frutos de embriones zigóticos en el 5º mes de cuajado, se traslado dicho material vegetal en una bolsa de polipropileno y fue inmediatamente puesto una bandeja con detergente para la eliminación total de residuos externos. Para la prueba 1 del ensayo 1 se realizó la siembra el mismo día, para la prueba 2 del ensayo 1 se extrajo el epicarpio, dejándose las semillas en frascos con una solución de vitavax por 24 horas. Para ambos ensayos se procedió a realizar cortes alrededor del embrión, para reducir el tamaño de explante, estos fueron puestos en un Erlenmeyer, asegurado con una tapa de aluminio y conducido a la cámara de siembra para el proceso de desinfección.

#### **4.7.4 Desinfección e introducción del material vegetal**

Este proceso se realizó en la cámara de flujo laminar, se enjuagó el explante con H<sub>2</sub>O destilada estéril y enseguida se adicionó una solución de Hipoclorito de sodio al 0.5% y tween a razón de 5 mg/l, por espacio de 10 minutos, una vez concluido este tiempo se realizaron enjuagues consecutivos (6 veces). Una vez terminado el proceso de desinfección se procedió a sostener cada explante con una pinza y con ayuda de un bisturí se procedió a realizar la extracción del embrión,

retirando en primera instancia el opérculo que cubre a este, después se inoculó de forma vertical el embrión en el medio de cultivo que contenían los tubos de ensayos, finalmente se sellaron y rotularon.

#### **4.7.5 Incubación de explantes**

Las unidades experimentales se agruparon y se incubaron en oscuridad durante 25 días, mantenidos a condiciones ambientales controladas con una temperatura promedio de 25°C y una H.R promedio de 46%.

### **4.8 DESARROLLO DEL ESTUDIO PARA EL ENSAYO 2**

#### **4.8.1 Medio de cultivo**

Se utilizaron 4 medios de cultivo M&S (1962), M&S ½, Woody plant Medium (WPM) y Medio Heller, suplementado con vitaminas del medio M&S para los 4 medios, 20.0 g/l de glucosa, 2 g/l de carbón activado, 50.00 mg/l de 2,4-D y 2.0 g/l de phytigel como base, y 4 diferentes concentraciones de Thidiazuron (0.000, 0.001, 0.003 y 0.005 mg/l).

Para la preparación del material vegetal y la siembra in vitro, se procedió de modo semejante al ensayo 1, el protocolo establecido para la extracción y siembra de embriones zigóticos de *Mauritia flexuosa* L. F., se reporta en resultados.

## **4.9 PARÁMETROS DE EVALUACIÓN**

### **A. Parámetros para el ensayo 01**

- Porcentaje de contaminación en embriones.- Realizado a los 05 días después de la siembra y 15 días después de la siembra

### **B. Parámetros para el ensayo 02**

- Porcentaje de inducción de embriogénesis somática. Se hizo una evaluación cualitativa por cada tubo de ensayo en los tiempos establecidos por cada tratamiento. (20, 25 y 30 días)
- Caracterización de la embriogénesis somática.- Para cada tratamiento se evaluó los cambios morfológicos de los embriones zigóticos sometidas al proceso de la embriogénesis somática.
- Evaluación de forma y tipo de callos.- Se caracterizó en forma visual la forma y tipo de callo.

## V. RESULTADOS

### 5.1 PROTOCOLO PARA LA EXTRACCIÓN Y ESTABLECIMIENTO DE EMBRIONES ZIGÓTICOS DE AGUAJE A CONDICIONES IN VITRO.

Diagrama del proceso de extracción, desinfección, siembra e incubación de embriones zigóticos de aguaje.

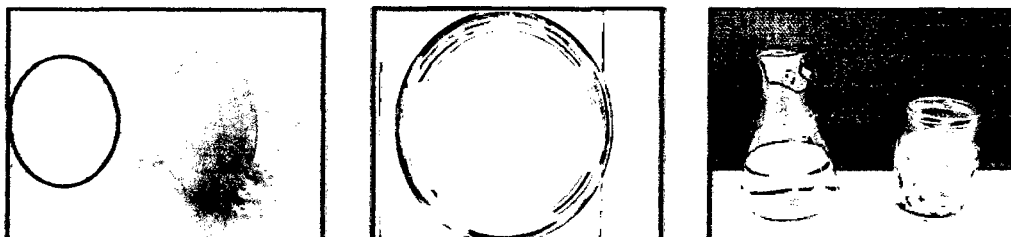
#### 1.- Extracción de la semilla de aguaje:



#### 2.- Corte del endosperma alrededor del embrión con mucho cuidado y dejando un pequeño espacio para no lastimar al mismo:



#### *Semilla cortada vs. S. entera*      *Semillas cortadas en H<sub>2</sub>O*      *Semillas en desinfección*

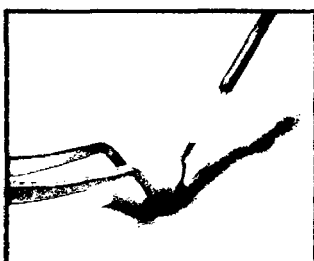


**3.- Desinfección de semillas con una solución de Hipoclorito de Sodio al 0.5 %, por 10 minutos y enjuagado 6 veces con H<sub>2</sub>O destilada estéril.**



#### **4.- Extracción y siembra del embrión:**

*Se realizó con la ayuda de una pinza y el bisturí N° 10.*

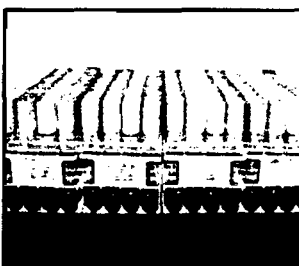


#### **5.- Incubación:**

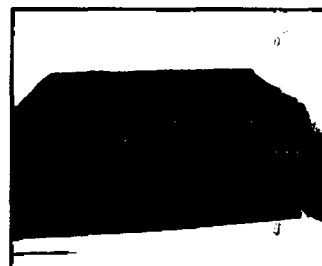
*En el tubo de ensayo*



*Gradillas en incubación*



*Cámara oscura*



## 5.2 RESULTADOS DEL PRIMER ENSAYO

### 5.2.1 Determinación del % Contaminación en embriones de *Mauritia flexuosa* L. f.

**Cuadro 9:** Análisis de varianza, para el porcentaje de contaminación microbiana en embriones de aguaje (*Mauritia flexuosa* L. f.) evaluado a los 5 y 15 días después de la siembra. Datos transformados  $\text{Arcosen} \sqrt{\%/100}$ .

F.V.	Gl	SC	CM	F	p-valor	Singf.
Tratamientos	3	1.0000	0.3300	376.79	<0,0001	**
Factor A	1	0.8200	0.8200	924.57	<0,0001	**
Factor B	1	0.1800	0.1800	201.79	<0,0001	**
Factor A*Factor B	1	0.0035	0.0035	3.99	0.0502	**
Error	60	0.0500	0.0009			
Total	63	1.06				

n.s = No significativo,

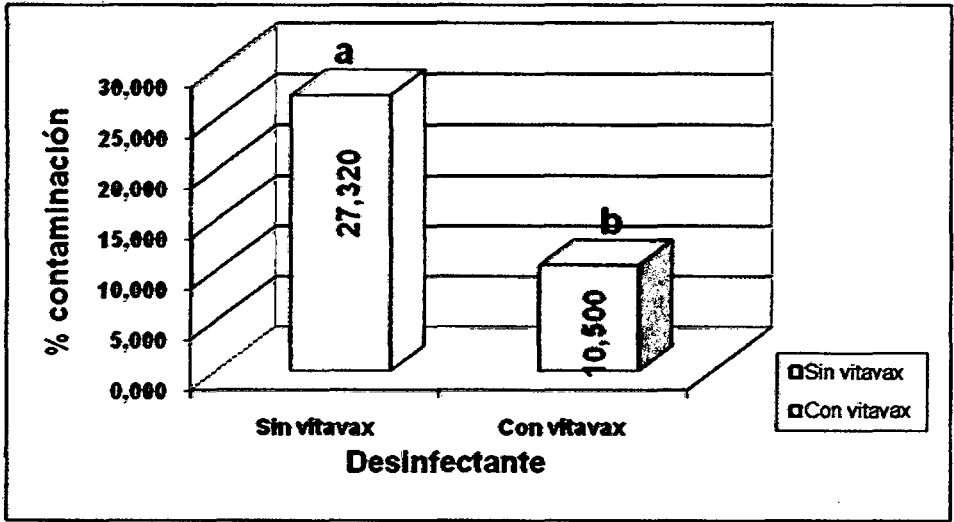
\*=Significativo.

\*\*= Altamente significativo.

$\bar{X} = 19,32\%$

$R^2 = 95,0 \%$

C.V. = 6,76%



**Gráfico 1:** Prueba de Duncan ( $p < 0,01$ ) para el efecto desinfectante (A).

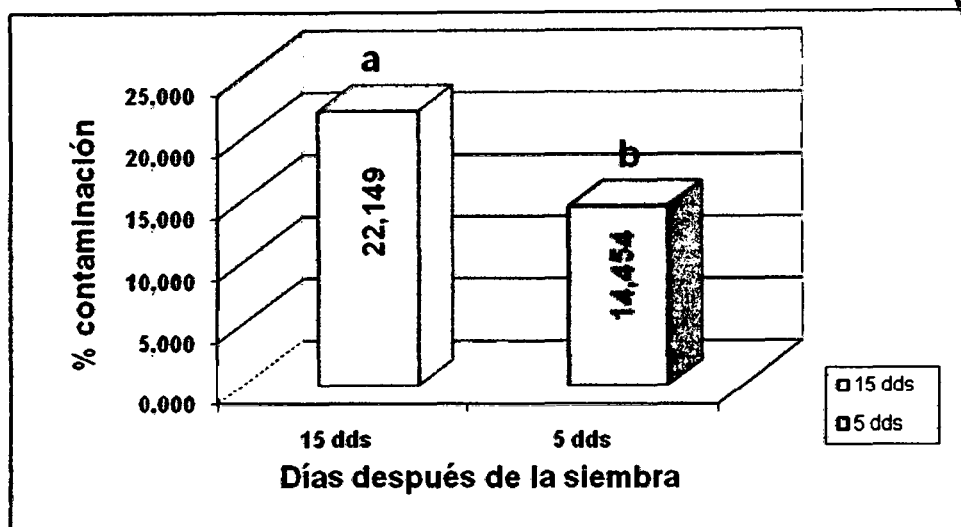


Gráfico 2: Prueba de Duncan ( $p < 0,01$ ) para el efecto tiempo (días).

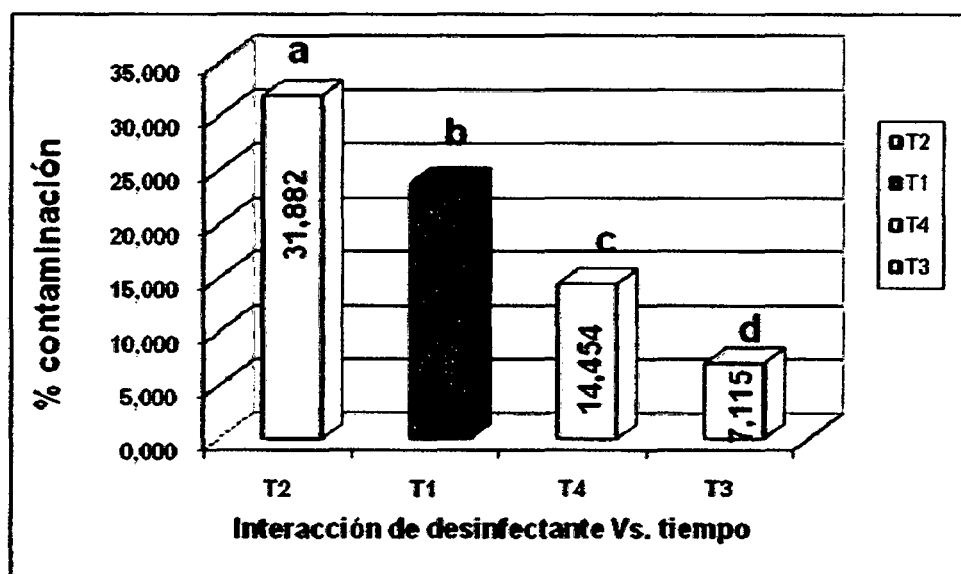


Gráfico 3: Prueba de Duncan ( $p < 0,01$ ) para la interacción desinfectante (A) y tiempo de establecimiento (B).



5.3 RESULTADOS DEL SEGUNDO ENSAYO

5.3.1 % de Inducción de la embriogénesis somática a los 20 días después de la siembra.

Cuadro 10: Análisis de varianza, para el porcentaje de inducción de callos en embriones de aguaje (*Mauritia flexuosa* L. f.) evaluado a los 20 días. Datos transformados Arcosen  $\sqrt{\%/100}$ .

F.V.	Gl	SC	CM	F	p-valor	Singf.
Tratamientos	15	1,155	0,077	6,16	0,0004	**
Factor A	3	0,08	0,0267	2,1333	0,1361	N.S
Factor B	3	0,9675	0,3225	25,8	<0,0001	**
Factor A*Factor B	9	0,1075	0,0119	0,9556	0,5079	N.S
Error	16	0,2	0,0125			
Total	31	1,355				

n.s= No significativo                      \*=Significativo                      \*\*= Altamente significativo.

$\bar{X}$  = 5,82%                                       $R^2$  = 85,24 %                                      C.V. = 68,80%

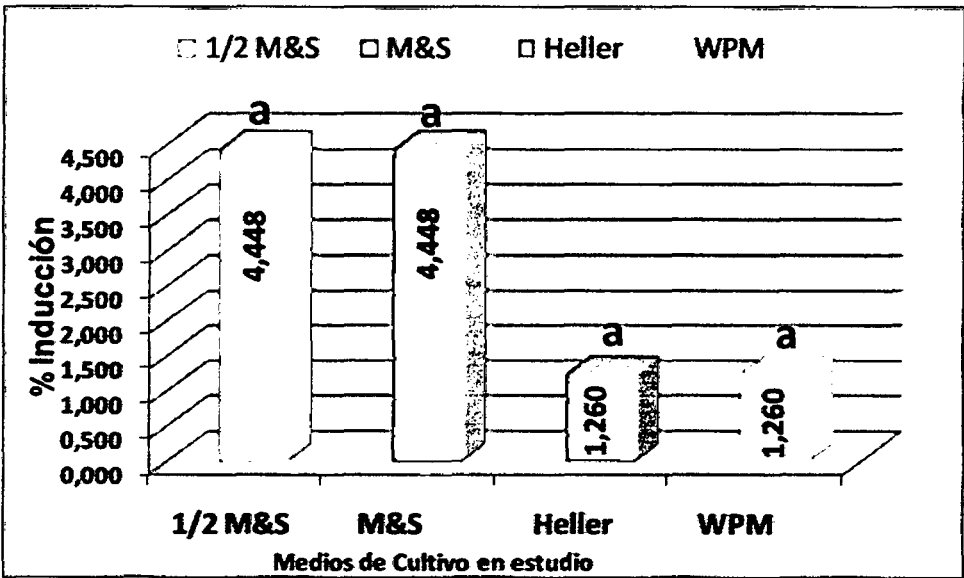
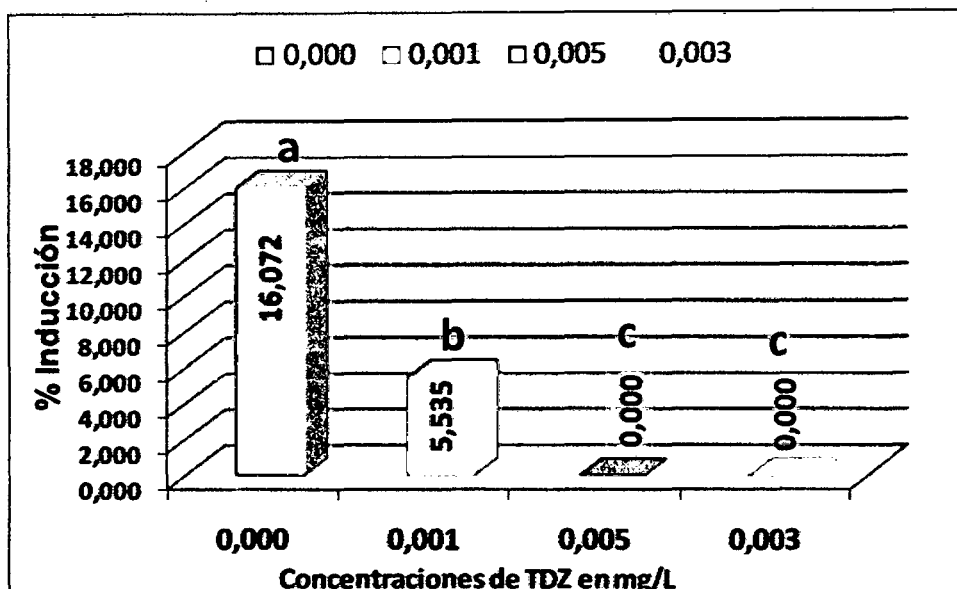
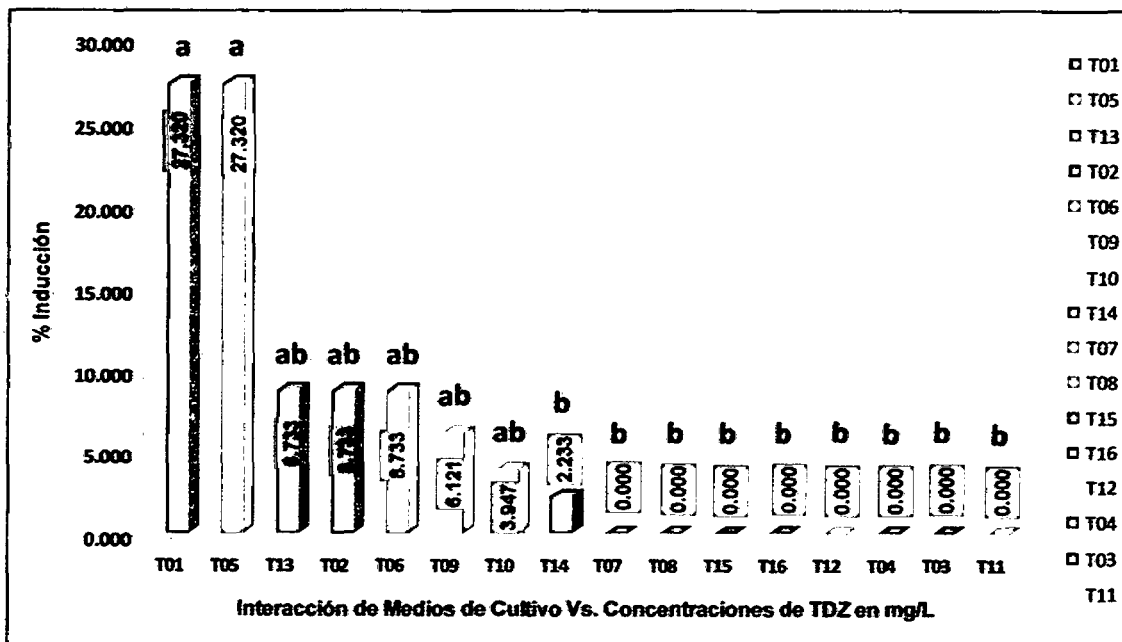


Gráfico 4: Prueba de Duncan ( $p<0,01$ ) para evaluar el efecto de la composición mineral de 4 Medios de Cultivo (A), en la inducción de embriogénesis somática, a los 20 dds.



**Gráfico 5:** Prueba de Duncan ( $p < 0,01$ ) para evaluar el efecto de 4 concentraciones de TDZ (B), en la inducción de embriogénesis somática, a los 20 dds



**Gráfico 6:** Prueba de Duncan ( $p < 0,01$ ) de la interacción medios de cultivo (A) y concentración de TDZ (B) en la inducción de embriogénesis somática, a los 20 dds.

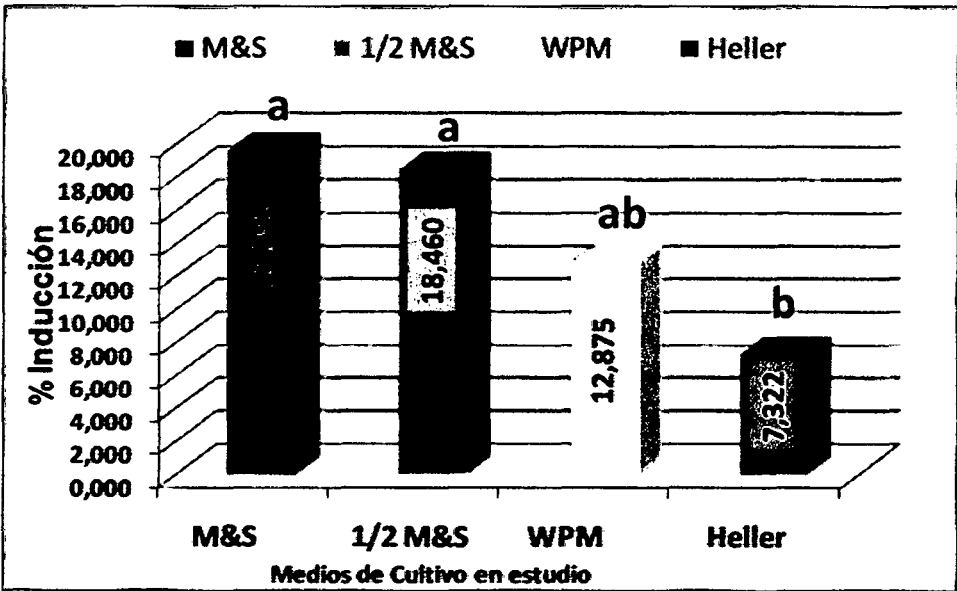
5.3.2 % de Inducción de la embriogénesis somática a los 25 días después de la siembra.

**Cuadro 11:** Análisis de varianza, para el porcentaje de inducción de callos en embriones de aguaje (*Mauritia flexuosa* L. f.) evaluado a los 25 días. Datos transformados Arcosen  $\sqrt{\%/100}$ .

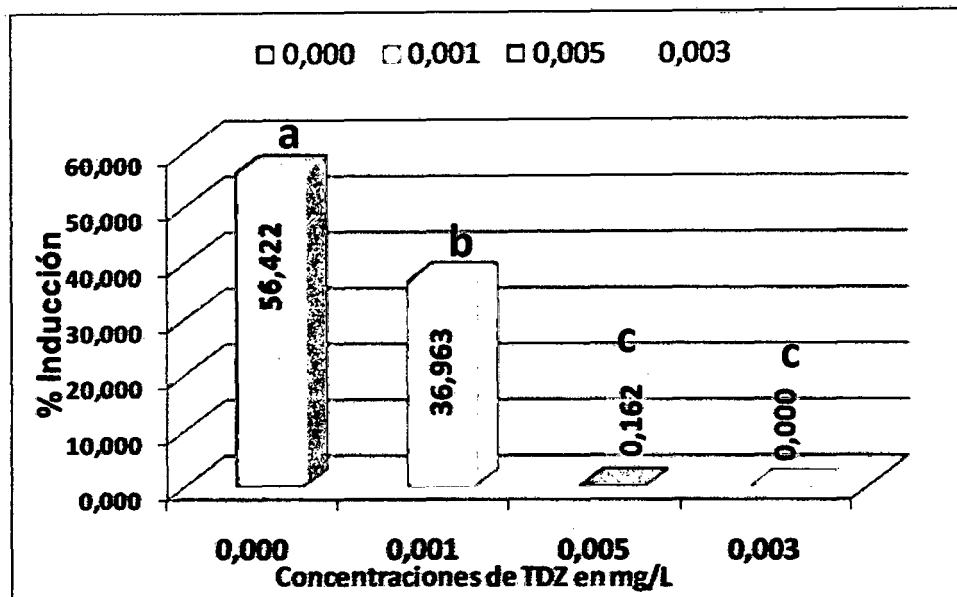
F.V.	gl	SC	CM	F	p-valor	Singf.
Tratamientos	15	4,774	0,3183	42,5585	<0,0001	**
Factor A	3	0,1724	0,0575	7,6846	0,0021	**
Factor B	3	4,4421	1,4807	197,9978	<0,0001	**
Factor A*Factor B	9	0,1595	0,0177	2,37	0,0634	N.S
Error	16	0,1197	0,0075			
Total	31	4,8937				

n.s= No significativo.      \*=Significativo.      \*\*= Altamente significativo.

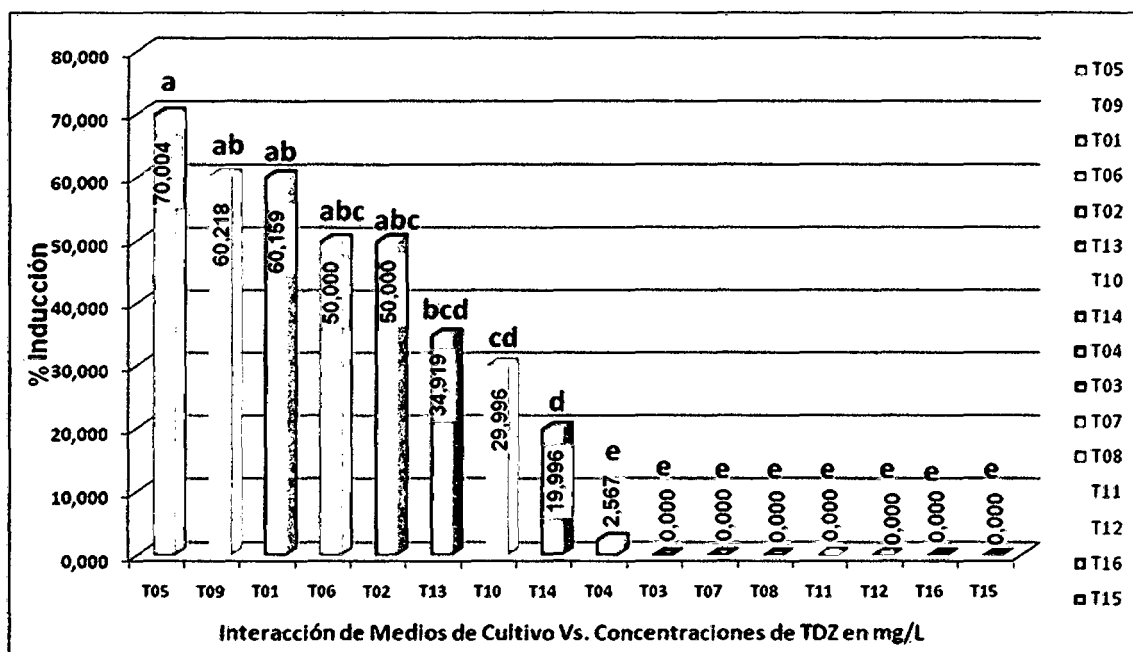
$\bar{X}$  = 23,62%                                       $R^2$  = 97,55 %                                      C.V. = 22,40%



**Gráfico 7:** Prueba de Duncan ( $p<0,01$ ) para evaluar el efecto de la composición mineral de 4 Medios de Cultivo (A), en la inducción de embriogénesis somática a los 25 días.



**Gráfico 8:** Prueba de Duncan ( $p<0,01$ ) para evaluar el efecto de 4 concentraciones de TDZ (B), en la inducción de embriogénesis somática, a los 25 días.



**Gráfico 9:** Prueba de Duncan ( $p<0,01$ ) de la interacción medios de cultivo (A) y concentración de TDZ (B) en la inducción de embriogénesis somática, a los 25 días.

### 5.3.3 % Inducción a la embriogénesis somática a los 30 días después de la siembra.

**Cuadro 12:** Análisis de varianza, para el porcentaje de inducción de callos en embriones de aguaje (*Mauritia flexuosa* L. f.) evaluado a los 30 días. Datos transformados Arcosen  $\sqrt{\%/100}$ .

F.V.	gl	SC	CM	F	p-valor	Sigf.
Tratamientos	15	5,711	0,3807	53,6839	<0,0001	**
Factor A	3	0,1319	0,044	6,2002	0,0054	**
Factor B	3	5,4027	1,8009	253,9296	<0,0001	**
Factor A*Factor B	9	0,1764	0,0196	2,7633	0,0366	*
Error	16	0,1135	0,0071			
<b>Total</b>	<b>31</b>	<b>5,8245</b>				

n.s= No significativo.

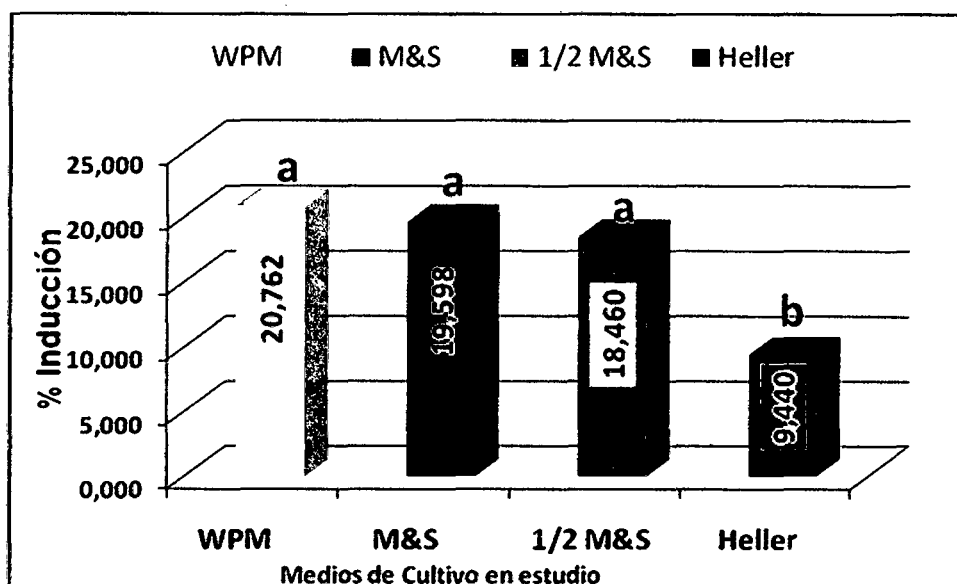
\*=Significativo.

\*\*= Altamente significativo

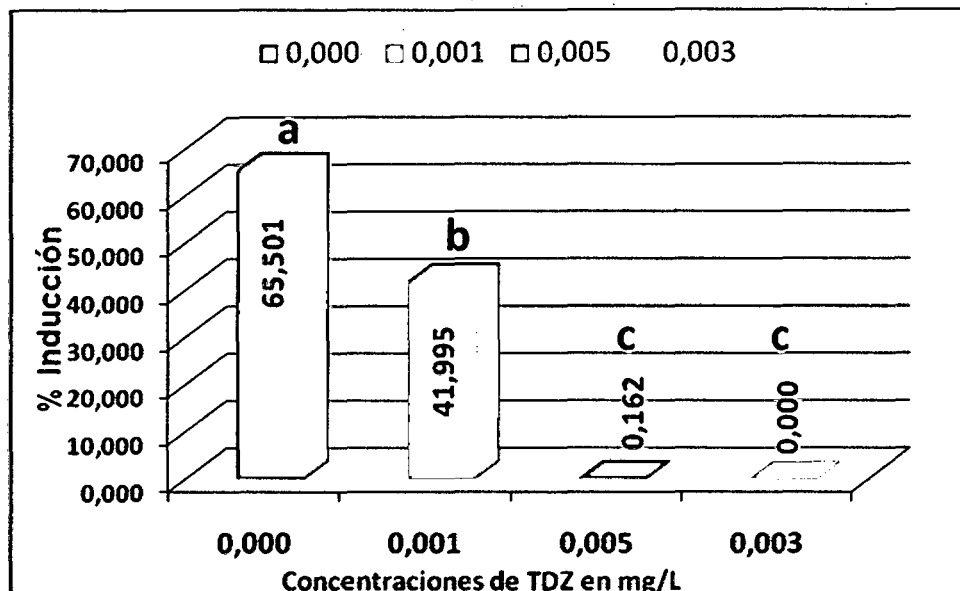
$\bar{X} = 27,05\%$

$R^2 = 98,05 \%$

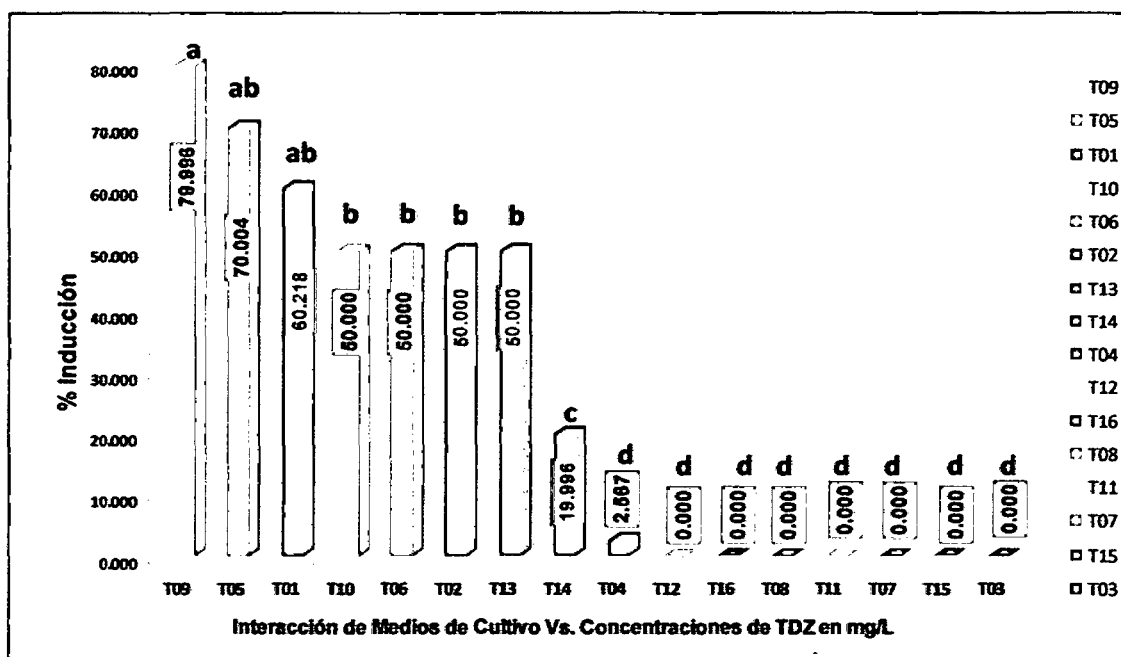
C.V. = 19,95%



**Gráfico 10:** Prueba de Duncan ( $p < 0,01$ ) para evaluar el efecto de la composición mineral de 4 Medios de Cultivo (A), en la inducción de embriogénesis somática a los 30 días.



**Gráfico 11:** Prueba de Duncan ( $p < 0,01$ ) para evaluar el efecto de 4 concentraciones de TDZ (B), en la inducción de embriogénesis somática, a los 30 días.



**Gráfico 12:** Prueba de Duncan ( $p < 0,01$ ) de la interacción medios de cultivo (A) y concentración de TDZ (B) en la inducción de embriogénesis somática, a los 30 días.

#### 5.3.4 Caracterización de la embriogénesis somática en los tratamientos puestos en estudio.

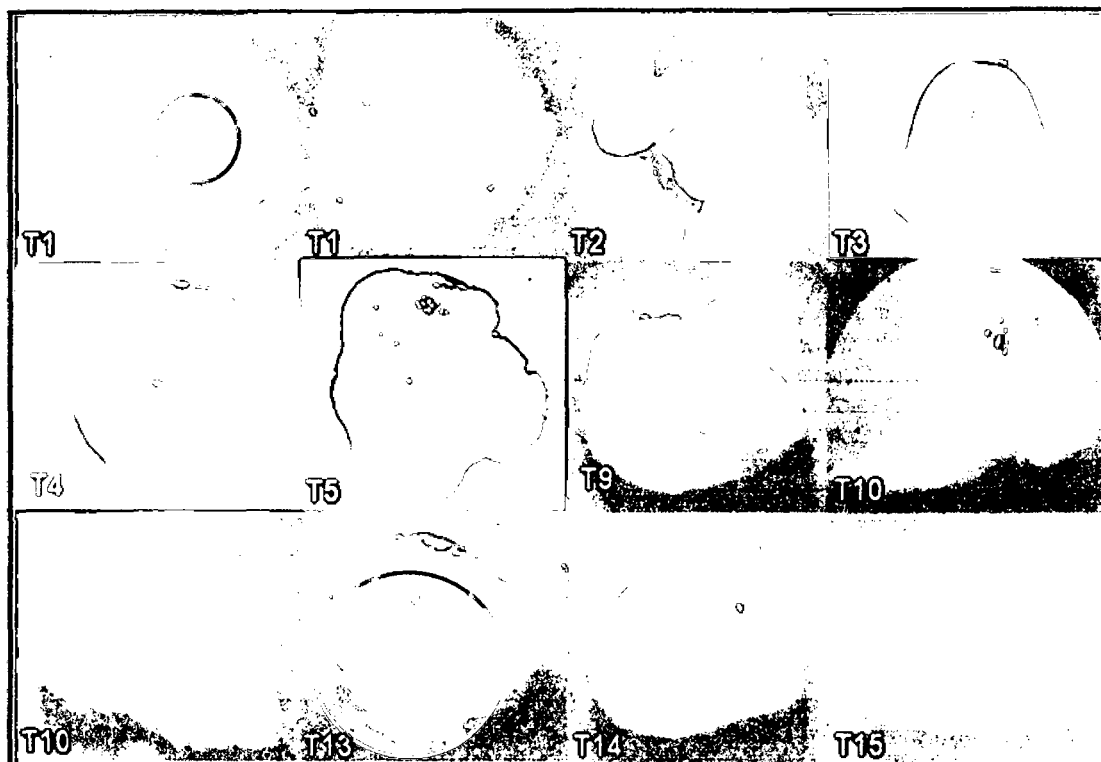


Figura N° 8: T<sub>1</sub>-T<sub>15</sub>. T<sub>1</sub>: Presencia de estructuras callosas a los 25 dds, T<sub>2</sub>: 2 tipos de callos, compacto y friable a los 25 dds, T<sub>3</sub>: No muestra ninguna respuesta al igual que los tratamientos T<sub>4</sub>, T<sub>6</sub>, T<sub>7</sub>, T<sub>15</sub> y T<sub>16</sub>. T<sub>5</sub>: Muestra una combinación de callos o células callosas. T<sub>9</sub>: Formación de estructuras pro-embriónicas en la parte media del embrión. T<sub>10</sub>: Formación de callos y estructuras nodulares en la parte proximal del embrión y aparición de plúmula incolora. T<sub>10</sub>: Estructuras que presentan formación directa de estructuras pro-embriónicas. T<sub>13</sub>: Posibles embrioides a los 25 dds. T<sub>14</sub>: Imbibición y apariencia transparente del embrión.

**Nota:** Los resultados de este trabajo constituyen la primera mención sobre la inducción de embriogénesis somática a partir de embriones zigóticos en *Mauritia flexuosa* L. f.



## **VI. DISCUSIÓN**

### **6.1 PARA EL PRIMER ENSAYO**

#### **6.1.1 Contaminación de embriones.**

El estudio realizado en cuanto a 2 pruebas de tratamientos de desinfección, nos muestra una clara evidencia de que adicionando un fungicida, en este caso Vitavax, como tratamiento previo a la siembra, se obtiene menos porcentaje de contaminación, a los 5 días después de la siembra y a los 15 días después de la siembra.

Evitar la contaminación con microorganismos es un aspecto básico que se debe tener en cuenta para el éxito, no solamente en el establecimiento de los cultivos, sino en su ulterior incubación y manipulación (Mroginski y Roca, 1991). Si la esterilización inicial de la superficie del explante es ineficiente, hongos, levaduras y bacterias pueden ser introducidas en el cultivo *in vitro* con el material vegetal (Leifert *et al.*, 1991). Es importante señalar que el procedimiento para la desinfección superficial de los explantes debe permitir eliminar los microorganismos procurando el menor daño posible para los explantes (Mroginski y Roca, 1991).

A partir de los resultados obtenidos, se puede afirmar que se ha logrado estandarizar un tratamiento de desinfección adecuado para el establecimiento de cultivos asépticos en embriones zigóticos de aguaje.

## **6.2 PARA EL SEGUNDO ENSAYO**

### **6.2.1 Porcentaje de inducción:**

Concentraciones de TDZ superiores a 0.0001 mg/l, inhiben la inducción de la embriogénesis somática en presencia de 2,4D, ya que todos los tratamientos que fueron adicionados con dosis de 0.003 y 0.005 mg/l de TDZ respectivamente, no presentaron respuesta alguna para la inducción de embriogénesis somática en aguaje, discrepando así con Córdoba (2005), que trabajó con embriones zigóticos de mango de hilacha, quien obtiene respuestas favorables con dosis que oscilan entre 0,5 mg/l de TDZ y 2 mg/l de 2,4 D.

La mejor combinación encontrada en el desarrollo del presente trabajo de investigación fue la fórmula compuesta por Murashige &Skoog total + 50mg/l de 2,4D + 0.000mg/l de TDZ, siguiendo por sus características favorables los medios: Murashige &Skoog a ½ de concentración de sales minerales + 50mg/l de 2,4D + 0.000mg/l de TDZ Woody plant Medium + 50mg/l de 2,4D + 0.000mg/l de TDZ.

### **6.2.2 Caracterización de la embriogénesis somática en los tratamientos en estudio.**

Realizando el análisis de las imágenes para los dieciséis tratamientos nos muestra que, los tratamientos T1, T2, T5 y T9, muestran estructuras callosas con 25 días de incubación. Adicionalmente los tratamientos T10 y T13, muestran características de embrioides y

también se observan regiones con estructuras globulares pre-embrionarias, unidades que anticipan la formación del primer estadio globular. Resultados morfológicos muy consecuentes a lo que explica detalladamente (Radice, 1994), sobre los procesos morfogénicos de las células.

La conformación nodos callosos fue uno de las observaciones más importantes, estos nodos callosos o complejos pro embrionarios son estructuras que además de poder organizarse y expresar la organogénesis, tienen la capacidad de poder formar embrioides dependiendo de la condición mas favorable para su cultivo, tal y como lo ha demostrado Hacıuss (1978), Raghavan (1976) y Tisserat et al., (1979).

## VII. CONCLUSIONES



- 7.1 Se ha logrado desarrollar una metodología para la introducción y el establecimiento de embriones zigóticos de aguaje (*Mauritia flexuosa* L. f.) a condiciones de cultivo in vitro.
- 7.2 Se ha determinado que existe un alta respuesta a la inducción de embriogénesis somática en aguaje (*Mauritia flexuosa* L. f.) en el medio M&S a concentración total.
- 7.3 El Thidiazuron en la inducción de embriogénesis somática en aguaje (*Mauritia flexuosa* L. f.) no es indispensable ni muestra resultados favorables con la adición de este componente en dosis mayores al 0,001 mg/L

## **VIII. RECOMENDACIONES**

- 8.1** Realizar un estudio del desarrollo embrionario zigótico a fin de compararlo con el desarrollo embrionario somático.
- 8.2** Realizar subcultivos de los callos obtenidos a fin de contar con mas material para la realización de ensayos de desarrollo, maduración y germinación de embrioides somáticos.
- 8.3** Evaluar los niveles endógenos de auxinas, citocininas, giberelinas y ácido abscísico durante la etapa de inducción de la embriogénesis, lo que permitirá comparar con procesos similares en otras especies vegetales.
- 8.4** Utilizar los callos embriogénicos en ensayos de establecimiento de suspensiones celulares embriogénicas como una alternativa para la producción de semilla sintética en *Mauritia flexuosa* L.
- 8.5** Continuar con los estudios agronómicos, biológicos y químicos en beneficio de la especie *Mauritia flexuosa* L. f. que se constituye en una fuente importante de compuestos químicos y símbolo importante de nuestra amazonía.

## **IX. RESÚMEN**

En esta investigación se estudió el establecimiento de un medio de cultivo para la inducción de la embriogénesis somática a partir de embriones zigóticos de frutos inmaduros de aguaje (*Mauritia flexuosa* L. f.). Se ensayaron dos tratamientos de desinfección, el primero sin tratamiento previo de fungicida aplicado a las semillas, y el segundo con tratamiento previo de fungicida, la desinfección adicional se hizo con Hipoclorito de sodio al 0.5% + 5ml/L de Tween por 10 minutos y se enjuagó con agua destilada estéril. Para el establecimiento del medio de cultivo para la inducción de la embriogénesis somática se probaron 4 medios de cultivo, adicionados con 50 mg/l de 2,4-D y con 4 niveles de TDZ ( 0; 0,001;0,003 y 0,005 mg/L). Mediante observación, se estudió la influencia de las diferentes concentraciones de ácido diclorofenoxiacético y de thidiazurom sobre los explantes utilizados; adicionalmente, se evaluó la formación de las diferentes etapas de la embriogénesis somática. Se estudió el proceso de formación del callo friable y embriogénico. El porcentaje de contaminación disminuyó significativamente con la aplicación de Vitavax (0.5mg/L) 24 horas antes de la siembra, y el tratamiento de desinfección aplicado fue de una solución de Hipoclorito de Sodio al 0.5% más 5 ml/L de Tween por 10 minutos.

La composición mineral mas apropiada para la inducción de embriones somáticos de aguaje corresponde al medio de cultivo Murashige &Skoog a concentración total + 50mg/l de 2,4D + 0 mg/L de TDZ. En los tratamientos T1, T2, T5 y T9, se observó la aparición de callos embriogénicos con estructuras globulares pro embrionarias a los 25 días de incubación.

## **X. SUMMARY**

In this research, the subject was the establishment of one culture media for the induction of somatic embryogenesis from zygotic embryos of immature fruits of aguaje (*Maturitia flexuosa* L.). Two treatments of disinfection were tested, the first one with no previous fungicide application to the seeds, and the second one with a previous fungicide application, the additional disinfection was done with a 0,5% Sodium hypochlorite solution + 5 mL/L of Tween for a 10 minutes period, and was later rinsed with sterile distilled water. In order to establish the culture media for the induction of somatic embryogenesis, 4 culture media were tested, added with 50 mg/L of 2,4-D y 4 levels of TDZ (0; 0,001; 0,003 y 0,005 mg/L). With this observation, the effect of different concentrations of dychlorophenoxyacetic acid and thidiazuron over the used explants was studied, additionally, the formation of the different stages of somatic embryogenesis was evaluated. the process of friable and embryogenic callus formation were studied. The contamination percentage decreased significantly with the application of Vitavax (0,5 mg/L) 24 hours prior to the seed, and the applied disinfection treatment was a 0,5 % sodium hypochlorite solution plus 5 mL/L of Tween for a 10 minutes period.

The most appropriate mineral concentration for the induction of somatic embryos is the Murahige & Skoog culture media, at total concentration + 50 mg/L of 2,4-D + 0 mg/L of TDZ. In the treatments T1, T2, T5 and T9, it was observed the presence of embryogenic callus with pro-embryo globular structures within 25 days of incubation.

## **XI. BIBLIOGRAFIA**

1. **AMMIRATO, P. V.** 1983. Embryogenesis. In: EVANS, D. A.; SHARP, W. R.; AMMIRATO, P. V.; YAMADA, Y. eds. Handbook of Plant Cell Cultures. New York, McMillan, V. 1. P. 82 – 123.
2. **BALICK, M.J.** 1979. Amazonian oil palms of promise: a survey. En: The New York Botanical Garden. Economic Botany 33(1). P.11-28.
3. **CHÉE, R. P. y CANTLIFFE, D. J.** 1989. Composition of embryogenic suspension cultures of *Ipomea batatas* Poir. and production of individualized embryos. Plant Cell Tiss. Org. Cult.
4. **CÓRDOVA SÁNCHEZ, J. M. y PEREA DALLOS, M.** 2005. Inducción de la embriogénesis somática en mango de hilacha (*Mangifera indica* L.). Acta Biológica Colombiana, Vol 10, Nº 1, 79 P.
5. **CRONQUIST, A.** 1998. The Evolution and Classification of Flowering Plants. 2da Edition. The New York Botanical Garden. New York – USA.
6. **DEL CASTILLO, D.; OTÁROLA, E.; FREITAS, L.** 2006. Aguaje, la maravillosa palmera de la Amazonía. Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana. Ediciones Wust. 51 P.



7. **DELGADO, G. E. 1995.** Cultura de tecidos de batata doce (*Ipomea batatas* L.): Propagação, morfogenese e variação somaclonal. Ph. D. Tese. IB/USP. 166 P.
8. **DELGADO, G. y ROJAS C. 1999.** Cultivo de Tejidos Vegetales. Fundamentos y Aplicaciones. Universidad Pedro Ruíz Gallo. Lambayeque-Perú. 166-191, 221-254 P.
9. **ECHENIQUE, RUBISTEIN y MROGINSKI. 2004.** Biotecnología y Mejoramiento vegetal.
10. **FLORES, P.S. 1997.** Cultivo de frutales Nativos Amazónicos. Tratado de Cooperación Amazónica. Proyecto RLA/92/g32, Lima, P. 307.
11. **FLORES, M & DELGADO, G. E. 1985.** Modelo de evaluación de los caracteres morfológicos de plantas de yuca (*Manihot esculenta* Crantz) regeneradas de meristemas y nudos in vitro. III Congreso Nacional de Botánica. Iquitos, Perú. P. 15-16.
12. **GARCÍA, A. y PINTO, J. 2002.** "Diagnóstico de la demanda del aguaje en Iquitos", Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana.
13. **GEORGE, E.F y SHERRINGTON, P.D. 1983.** Plant Propagation by Tissue Culture. Part. 1. The Technology. Exegetics Ltd. 709 P.

14. **GONZÁLEZ, M. SANTANA, N. FERRER, M. & CABRERA, M. 1999.**  
Influencia de diferentes factores en embriogénesis somática de  
*Coffea canephora* P. EN: 5 Coloquio Internacional de  
Biotecnología Vegetal. Villa Clara. Cuba. P. 120 - 122.
15. **GREY, D.; STEPAN-SARKISSIAN, G. FOWLER, M. W. 1987.**  
Biochemistry of forest tree species in culture. In: BONGA, J. M.  
& DURZAN, D. J. eds. Cell and tissue Culture in Forestry.  
Dordrecht, Martinus Nijhoff Publishers. V. 2. P. 31 – 60.
16. **GUERRA, M. P. y HANDRO, W. 1988.** Somatic embryogenesis and  
plant regeneration in embryo cultures of *Euterpe edulis*. Mart.  
(Palmae). Plant cell Rep. 7:550-552. P.
17. **HALPERIN, W., y WETHERELL, D.F. 1965.** Ammonium Requirement  
for Embryogenesis in vitro. Nature 205:519-520 P.
18. **HALPERIN, W. 1966.** Alternative Morphogenic Events in Cell  
Suspensions. AMER. J. Bot. 53:443-453 P.
19. **HACIUS, B. 1978.** Question of Unicellular Origin of Non-zygotic  
Embryos in Callus Cultures. Phytomorphology 28:74-81 P.
20. **HENDERSON, A. 1995.** *The Palmae of the Amazon*. Oxford University  
Press, New York. 326 P.

21. LEIFERT, C., CAMOTTA, H., WRIGHT, S. M., WAITES, B., CHEYNE, V. A. y WAITES, W. M. 1991. Elimination of *Lactobacillus plantarum*, *Corynebacterium* spp., *Staphylococcus saprophyticus* and *Pseudomonas paucimobilis* from micropropagated *Hemerocacillis*, *Choisya* and *Delphinium* cultures using antibiotics. J. Appl. Bact. 71: 307-330 P.
22. LINDSEY, K. y TOPPING, J. F. 1993. Embryogenesis: a question of pattern. J. Exp. Bot.
23. PADOCH, C. 1992. Marketing of Non-Timber forest Products in Western Amazonia: General Observations and Research Priorities. In: Advances in Economic Botany 9 : 43-50. The New York Botanical Garden.
24. PAULA-FERNADES, N. M. 2001. Estratégias de produção de sementes e estabelecimento de plântulas de *Mauritia flexuosa* L. f. (Arecaceae) no Vale do Acre/Brasil. Tese de doutorado – UA/INPA. Manaus. 205 P.
25. PIO CORREA, M. 1926 Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Imprensa Nacional, Rio de Janeiro. v. I.
26. RADICE, S. 1994. Biotecnología y mejoramiento vegetal. Morfogénesis in Vitro. Cap II. 1-4 P.
27. RAGHAVAN, V. 1976. Experimental Embryogenesis in Vascular Plants. Academic Press. New Cork. 12: 23-50 P.

28. **REINERT, J.** 1958. Morphogenese und ihre Kontrolle an Gewebekulturen aus Karotten. *Naturwissenschaften* 45:344 P.
29. **REINERT, J.; BAJAJ, Y. P. S.; ZBELL, B.** 1977. Aspects of organization – organogenesis, embryogenesis, cytodifferentiation. In: **STREET, H. E.** ed. *Plant Tissue and Cell Culture*. Berkeley, University of California press. P. 384 – 427.
30. **ROCA, W Y L. MROGINSKI.** 1991. Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones. CIAT. 499 - 553 –554 P.
31. **ROJAS, R.** 2000. *En: Fundación Peruana para la Conservación de la Naturaleza – ProNaturaleza.* (2006). Estudio de las cadenas productivas de aguaje y tagua, Reserva Nacional Pacaya Samiria, Loreto – Perú).
32. **SAAVEDRA, G.** 2008. Estructuras de Hormonas Vegetales. Universidad de Concepción. Ciencia Ahora. 46 P.
33. **SALISBURY, F. B. y ROSS, C. W.** 1978. *Plant Physiology*. Wadsworth, Belmont. 422 P.
34. **STEEVES, T. A. y SUSSEX, I. M.** 1989. *Patterns in Plant Development*. 2<sup>da</sup>. Ed. Cambridge: Cambridge University Press.
35. **STORTI, E.F.** 1993. Biología floral de *Mauritia flexuosa* Lin. Fil, na região de Manaus, Am, Brasil. *Acta amazônica* 23 (4): 371-381 P.

36. **STEWART, F. C., MAPES, M. O. & MEARS, K.** 1958. Growth and organized development of culture cells. II. Organization in cultures grown from freely suspended cells. *Am. J. Bot.* 45:705
37. **TISSERAT, B., ESAN, E. & MURASHIGE, T.** 1979. Somatic embryogenesis in angiosperms. *Hort.* 1:78.
38. **UHL, N. W. y DRANSFIELD, J.** 1987. *Gera Palmarum a classification of Palms.* University and Royal Botanic Garden, Kew. 610 P.
39. **VÁSQUEZ - OCMÍN, P.G.** 2008. Caracterización de ácidos grasos,  $\beta$ -caroteno,  $\alpha$ -tocoferol y estabilidad oxidativa de los aceites de tres morfotipos de *Mauritia flexuosa* L.f., mediante cromatografía de gases, HPLC y Rancimat. Tesis para optar el título profesional de Químico Farmacéutico. Universidad Nacional de la Amazonía Peruana. Iquitos, Perú.
40. **VILLACHICA, H.** 1996. Frutales y hortalizas promisorios de la Amazonía. Secretaría Pro-Tempore, Tratado de Cooperación Amazónica, P.367.
41. **ZIMMERMAN, J. L.** 1993. Somatic embryogenesis: A model for early development in higher plants. *Plant Cell.*

**ANEXOS**

**Anexo N° 01:** Cuadro comparativo de la composición química de cuatro medios de cultivo usados en la inducción de embriogénesis somática en *Mauritia flexuosa* L. f.

<b>COMPOSICION (mg/L) DE LOS MEDIOS DE CULTIVO MURASHIGE &amp; SKOOG (1962), MURASHIGE &amp; SKOOG a 1/2 de cc. Woody Plant Medium (WPM) y Medio Heller.</b>						
<b>Composición</b>		<b>Unid.</b>	<b>MS</b>	<b>1/2MS</b>	<b>WPM</b>	<b>Heller</b>
<b>Macronutrientes</b>						
Nitrato de Sodio	NaNO <sub>3</sub>	mg/L				600.00
Nitrato de Potasio	KNO <sub>3</sub>	mg/L	1900.00	950.00		
Nitrato de Amonio	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	mg/L	1650.00	825.00	400.00	
Cloruro de Calcio dihidratado	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	mg/L	440.00	220.00	96.00	75.00
Sulfato de Magnesio Heptahidrato	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	mg/L	370.00	185.00	370.00	250.00
Fosfato de Potasio Monobásico	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	mg/L	170.00	85.00	170.00	
Nitrato de Calcio Tetrahidratado	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	mg/L			556.00	
Sulfato de Potasio	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	mg/L			990.00	
Cloruro de Potasio	KCl	mg/L				750.00
Fosfato diácido de Sodio	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	mg/L				125.00
<b>Micronutrientes</b>						
Sulfato de Manganeso Monohidrato	MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	mg/L	16.90	8.45	22.30	0.10
Ácido Bórico	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	mg/L	6.20	3.10	6.20	1.00
Sulfato de Zinc Heptahidrato	ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	mg/L	8.60	4.30	8.60	1.00
Yoduro de Potasio	KI	mg/L	0.83	0.42		0.01
Sulfato de Cobre Pentahidratado	CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	mg/L	0.03	0.01	0.25	0.03
Cloruro de Cobalto dihidrato	CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	mg/L	0.03	0.01		
Molibdato de Sodio Dihidratado	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	mg/L	0.25	0.13	0.25	
Sulfato ferroso heptahidratado	FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	mg/L	25.00	12.50	27.80	
cloruro de aluminio	AlCl <sub>3</sub>	mg/L				0.03
cloruro de níquel hexahidratado	NiCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	mg/L				0.03
cloruro de hierro hexahidratado	FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	mg/L				1.00
	Na <sub>2</sub> EDTA·2	mg/L	37.25	18.63	37.30	
<b>Vitaminas</b>						
Ácido Nicotínico		mg/L	0.50	0.50	0.50	0.50
Piridoxina		mg/L	0.50	0.50	0.50	0.50
Tiamina		mg/L	0.10	0.10	0.10	0.10
Mio Inositol		mg/L	100.00	100.00	100.00	100.00
<b>Hormonas</b>						
Ácido 2,4 diclorofenoxiacético		mg/L	50.00	50.00	50.00	50.00
TDZ		mg/L				
Sacarosa		mg/L	30.00	30.00	20.00	30.00
Carbón activado		mg/L	2.00	2.00	3.00	
Agar Agar		mg/L	4.00	4.00	7.00	8.00
pH			5.8	5.8	5.8	5.8

**Anexo N° 02 : Protocolo de preparación de soluciones stock de sales para el medio Murashige & Skoog (1962)**

Stock	Producto	Concentr. de Stock	Unid	Vol. final Stock (ml)	Pesar	Unid	Observaciones
Stock A	Nitrato de Amonio	82.60	g/l	250.00	20.6250	g	Disolver en agua destilada y enrazar a 250 mL. CORROSIVO, no pesar en papel aluminio
Stock B	Nitrato de Potasio	95.00	g/l	250.00	23.7500		Disolver en agua destilada y enrazar a 250 mL
Stock C	Cloruro de Calcio dihidratado	88.00	g/l	200.00	17.6000	g	Disolver en agua destilada y enrazar a 200 mL
Stock D	Fosfato de Potasio Monobásico	34.00	g/l	200.00	6.8000	g	Disolver en agua destilada y enrazar a 200 mL
Stock E			200.00				Este es un Stock compuesto por varios reactivos en muy bajas concentraciones, por lo que primero deben prepararse por separado
a. $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ Molibdato de Sodio Dihidratado		0.0500	g/l	0.0100	g	1.	Pesar 0,1g y disolver en 100ml $\text{H}_2\text{O}$
						2.	Tomar 10 ml de esta solución
						3.	Disolverlos en 200ml del stock E
						4.	Descartar los 90 ml restantes
b. $\text{CoCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ Cloruro de Cobalto dihidrato		0.0050	g/l	0.0010	g	1.	Pesar 0.1g y disolver en 100ml $\text{H}_2\text{O}$
						2.	Tomar 1 ml de esta solución
						3.	Disolver en 200ml del stock E
						4.	Descartar los 99 ml restantes
c. $\text{H}_3\text{BO}_3$ Ácido Bórico		1.2400	g/l	0.2480	g	Disolver con $\text{H}_2\text{O}$ directamente en el frasco de stock E	
						CORROSIVO, disolver inmediatamente.	
						PELIGROSO al contacto con la Piel	
d. KI		0.1660	g/l	0.0332	g	Disolver con $\text{H}_2\text{O}$ directamente en frasco de	



Yoduro de Potasio					stock E
Stock F		200.00		g	Este es un Stock compuesto por varios reactivos en muy bajas concentraciones, por lo que primero deben prepararse por separado
a. $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ Sulfato de Manganeso Monohidrato	3.3800 16.9000	g/l	0.6760	g	Disolver en $\text{H}_2\text{O}$ d directamente en el frasco de stock F
b. $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ Sulfato de Magnesio Heptahidrato	74.0000 370.0000	g/l	14.8000	g	Disolver en $\text{H}_2\text{O}$ d directamente en el frasco de stock F
c. $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ Sulfato de Zinc Heptahidrato	1.7250 8.6250	g/l	0.3450	g	Disolver en $\text{H}_2\text{O}$ d directamente en el frasco de stock F
d. $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ Sulfato de Cobre Pentahidratado	0.0050 0.0250	g/l	0.0010	g	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Pesar 0.1g y disolver en 100mL <math>\text{H}_2\text{O}</math></li> <li>2. Tomar 1 ml de esta solución</li> <li>3. Disolver en 200mL del stock</li> <li>4. Descartar los 99 ml restantes</li> </ol>
Stock G		250.00			Este es un Stock compuesto por varios reactivos en muy bajas concentraciones, por lo que primero deben prepararse por separado
a. $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ EDTA	1.8650	g/l	0.4663	g	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Disolver el EDTA en 200 mL de agua destilada, esperar 20 min.</li> <li>2. Calentar la solución hasta antes de hervir</li> </ol>
b. $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ Sulfato ferroso heptahidratado	1.3900	g/l	0.3475	g	<ol style="list-style-type: none"> <li>3. Agregar el <math>\text{FeSO}_4</math> lentamente hasta obtener una solución amarilla clara</li> <li>4. Almacenar en frasco oscuro y en refrigeración (<math>4^\circ\text{C}</math>)</li> </ol>

**Anexo N° 03 : Protocolo de preparación de soluciones stock de sales para el medio WPM Lloyd and Mc Crown (1970)**

Stock	Producto	Concentración Final en Medio de Cultivo	Und.	Concentr. de Stock	Unid	Vol. final Stock (ml)	Pesar	Und.	Vol. de Stock/l de medio	Und.	Observaciones
<b>Stock A</b>	Nitrato de Amonio <chem>NH4NO3</chem>	400.00	Mg/l	20.00	g/l	250.00	5.00	g	20.00	ml	Disolver en agua destilada y enrazar a 250 mL CORROSIVO, no dejar mucho tiempo en papel aluminio
<b>Stock B</b>	Cloruro de Calcio dihidratado ( <chem>CaCl2 . 2H2O</chem> )	96.00	Mg/l	4.80	g/l	250.00	1.20	g	20.00	ml	Disolver en agua destilada y enrazar a 250 mL
<b>Stock C</b>	Fosfato de Potasio ( <chem>KH2PO4</chem> )	170.00	Mg/l	8.50	g/l	250.00	2.13	g	20.00	ml	Disolver en agua destilada y enrazar a 250 mL
<b>Stock D</b>	Nitrato de Calcio Hidratado <chem>Ca(NO3)2 . H2O</chem>	556.00	Mg/l	27.80	g/l	250.00	6.95	g	20.00	ml	Disolver en agua destilada y enrazar a 250 mL
<b>Stock E</b>	Sulfato de potasio, <chem>K2SO4</chem>	990.00	Mg/l	49.500	g/l	250.00	12.38	g	20.00	ml	Disolver en agua destilada y enrazar a 250 mL
<b>Stock F</b>						200.00			5	ml	Este es un Stock compuesto por varios reactivos en muy bajas concentraciones, por lo que primero deben prepararse por separado
	a. <chem>Na2MoO4. H2O</chem> Molibdato de Sodio	0.25	Mg/l	0.05000	g/l		0.10	g			1. Pesar 0.1g y disolver en 100ml H <sub>2</sub> O 2. Tomar 10 ml de esta solución

									3. Disolver en 200ml del stock 4. Descartar los 90 ml restantes
<b>b. <math>\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}</math></b> Cloruro de Cobalto	0.03	Mg/l	0.00500	g/l		0.10	g		1. Pesar 0.1g y disolver en 100ml $\text{H}_2\text{O}$ 2. Tomar 1 ml de esta solución 3. Disolver en 200ml del stock 4. Descartar los 99 ml restantes
<b>c. <math>\text{H}_3\text{BO}_3</math></b> Ácido Bórico	6.2	Mg/l	1.24000	g/l		0.25	g		1. Pesar y disolver directamente
<b>d. KI</b> Yoduro de Potasio	0.83	Mg/l	0.1660	g/l		0.330	g		1. Pesar 0.33g y disolver en 100ml $\text{H}_2\text{O}$ 2. Tomar 10 ml de esta solución 3. Disolver en 200ml del stock 4. Descartar los 90 ml restantes
<b>Stock G</b>					200.00			20	ml Este es un Stock compuesto por varios reactivos en muy bajas concentraciones, por lo que primero deben prepararse por separado
<b>a. <math>\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}</math></b> .....OJO Sulfato de Manganeso	22.3	Mg/l	1.115	g/l		0.223	g		Pesar y disolver en $\text{H}_2\text{O}$ d directamente en el frasco de stock F
<b>c. <math>\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}</math></b> Sulfato de Magnesio Heptahidrato	370	Mg/l	18.500	g/l		3.70	g		Disolver en $\text{H}_2\text{O}$ d directamente en el frasco de stock F
<b>d. <math>\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}</math></b> Sulfato de Zinc Heptahidrato	8.6	Mg/l	0.430	g/l		0.86	g		1. Pesar 0,86g y disolver en 100ml $\text{H}_2\text{O}$ 2. Tomar 10 ml de esta solución 3. Disolverlos en 200ml del stock

									4.	Descartar los 90 ml restantes
e. $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ Sulfato de Cobre Pentahidratado	0.025	Mg/l	0.00125	g/l		0.125	g		1.	Pesar 0.125g y disolver en 100mL $\text{H}_2\text{O}$
									2.	Tomar 1 ml de esta solución
									3.	Disolver en 200mL del stock
									4.	Almacenar los 99 mL restantes en refrigeración para uso posterior
Stock H					250.00			20	mL	Este es un Stock compuesto por varios reactivos en muy bajas concentraciones, por lo que primero deben prepararse por separado
a. $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ EDTA	37.3	Mg/l	1.865	g/l		0.466	g		1.	Disolver el EDTA en 400 mL de agua destilada, esperar 20 min.
									2.	Calentar la solución hasta antes de hervir
b. $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ Sulfato ferroso heptahidratado	27.8	Mg/l	1.39	g/l		0.35	g		3.	Agregar el $\text{FeSO}_4$ lentamente hasta obtener una solución amarilla clara
									4.	Almacenar en frasco oscuro y en refrigeración ( $4^\circ\text{C}$ )

## **Anexo N° 04: Lista de materiales usados en el presente trabajo de investigación.**

### **🔧 Material vegetal.**

- 200 frutos de aguaje por ensayo instalado.

### **🔧 Materiales de vidrio.**

- Pipetas DIN/B de 25, 10, 5 y 1 ml
- Erlenmeyer pirex de 500, 250 y 125 ml
- Frascos autoclavables de 7 onz.
- Probetas de 250, 500 y 1000 ml
- Bageta de vidrio pirex de 30 cm
- Vaso de precipitado kimax de 500 y 1000 ml
- Mechero para alcohol.
- Placas petri.
- Pipetas volumétricas de 1, 5, 10, 20 ml.
- 1 Embudo de vidrio.
- Tubos de ensayo.

### **🔧 Materiales de metal.**

- Pinzas de acero inoxidable.
- Tijera quirúrgica de acero de 175 mm de longitud.
- Cuchillo de metal.
- Mango para hoja de bisturí N° 10, 11 de acero de 165 mm de longitud.
- Hojas de bisturí KIP N° 10, 11 y 21 descartables.

#### **⚡ Otros materiales**

- Guantes de látex N° 6.
- Marcador de vidrio.
- Papel aluminio.
- Mascarillas descartables.
- Papel toalla.
- Envases plásticos.

#### **⚡ Equipos**

- Autoclave vertical sercal de 40 l de capacidad.
- Potenciómetro schot.
- Cámara de flujo laminar horizontal.
- Destilador de agua sercal de 12 l/hora.
- Refrigerador.
- Aire acondicionado LG tipo ventana de 24000 BTU.
- Balanza analítica.
- Termómetro de máxima-mínima Stortz MMT-15/17.
- Cámara digital Samsung de 5.1 megapixels.

#### **⚡ Reactivos químicos**

- Alcohol etílico de 96°.
- Ácido bórico ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ )
- Ácido etilendiaminotetracético dihidratado ( $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )
- Ácido nicotínico

- Carbón activado
- Cloruro de aluminio ( $\text{AlCl}_3$ )
- Cloruro de calcio dihidratado ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )
- Cloruro de cobalto hexahidratado ( $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )
- Cloruro de fierro hexahidratado ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )
- Cloruro de níquel hexahidratado ( $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )
- Cloruro de potasio ( $\text{KCl}$ )
- Fosfato de potasio monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )
- Fosfato diácido de sodio ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ )
- Glicina
- Glutamina
- Ioduro de potasio ( $\text{KI}$ )
- Lejía comercial al 5,25% de  $\text{NaOCl}$
- Molibdato de sodio dihidratado ( $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )
- Myo-inositol
- Nitrato de amonio ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ )
- Nitrato de calcio tetrahidratado [ $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ]
- Nitrato de potasio ( $\text{KNO}_3$ )
- Nitrato de sodio ( $\text{NaNO}_3$ )
- Piridoxina-HCl
- Pastillas buffer pH= 4,0; pH= 7,0
- Phytigel SIGMA
- Sacarosa
- Sulfato de cobre pentahidratado ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ )

- Sulfato de fierro heptahidratado ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )
- Sulfato de magnesio heptahidratado ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )
- Sulfato de manganeso monohidratado ( $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ )
- Sulfato de potasio ( $\text{K}_2\text{SO}_4$ )
- Sulfato de zinc heptahidratado ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )
- Thidiazuron (TDZ) [1-fenil-3-(1,2,3-tiadiazol-5-il) urea]
- Tiamina-HCl
- 2,4-D (Ácido-2,4-diclorofenoxiacético)



## **Anexo N° 05: DATOS DE IDENTIFICACIÓN DEL THIDIAZURON (TDZ)**

**Nombre químico (IUPAC):** 1-Fenil-3-(1,2,3-tiadiazol-5-il)urea

**No. CAS:** 51707-55-2

**Sinónimos:** 02162 (CA DPR Chem Code); 1-Fenil-3-(1,2,3-tiadiazol-5-il)urea; 120301 (US EPA PC Code); 208100 (Old US EPA PC Code); 208100 (US EPA PC Code); 208800 (Old US EPA PC Code); 208800 (US EPA PC Code); 2162 (CA DPR Chem Code); 5-N-Fenilcarbamoilamino-1,2,3-tiadiazol; 51707-55-2 (CAS Number); 51707552; 51707552 (CAS Number); AE B049537; Dropp; Ginstar EC (120301+035505); N-Fenil-N'-(1,2,3-tiadiazil)urea; SN 49537; ThidiazuronM; Thidiazuron (ANSI); Urea, N-fenil-N'-1,2,3-tiadiazol-5-il; Urea, N-fenil-N'-1,2,3-tiadiazol-5-il (9CI); Use code no. 120301; Use code no. 120301

**Nombre comercial, Formulación (%), Presentación:**

**Para uso Agrícola:** Dropp 50 PH, 50.000, Polvo Humectable; Dropp 80 Técnico, 80.000, Polvo Técnico; Dropp Fluid, 20.000, Suspensión Concentrada

**Fórmula química:** C<sub>9</sub>H<sub>8</sub>N<sub>4</sub>OS

**Peso molecular:** 220.25

**Tipo de plaguicida:** Desfoliante

**Clasificación:** Derivado de la urea

**Uso:** Agrícola

**Presentaciones comerciales:** Agrícola: Desfoliante: como polvo humectable en equivalentes en gramos de ingrediente activo (l.A./kg o L) de: 500 y como suspensión concentrada en equivalentes en gramos de ingrediente activo (l.A./kg o L) de: 200. Para uso exclusivo en plantas formuladoras de plaguicidas agrícolas:

como polvo técnico en equivalentes en gramos de ingrediente activo (I.A./kg o L) de:  
800.

## **PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS**

Salud (Azul):

Inflamabilidad (Rojo):

Riesgo de Explosión (Amarillo):

## **DESTINO EN EL AMBIENTE**

**Persistencia:** Poco persistente (26 a 144 días)

## **TOXICIDAD PARA LOS ORGANISMOS Y EL MEDIO AMBIENTE**

**Tipo toxicológico:** IV, es moderadamente tóxico para el zooplancton y ligeramente tóxico para peces.

## **Anexo N° 06: DATOS DE IDENTIFICACIÓN DEL 2,4 D**

**Nombre químico (IUPAC):** Ácido 2,4-diclorofenoxiacético

**No. CAS:** 94-75-7

**Sinónimos:** Silvaprop 1; U 46 D; U 46; U 46DP; Ácido Acético, (2,4-Diclorofenoxi)-; Acide 2,4-Dichloro Phenoxyacetique (Francia); Acido(2,4-Dicloro-Fenossi)-Acetico (Italia); Acme LV 4; Acme LV 6; Agricorn D; Agroxone; Bladex-B; Brush Killer 64; Croprider; 2,4-D ACID; D50; Dacamine; De-Pester Ded-Weed LV-2; Desormone; 2,4-Dichloor-Fenoxi-Azijnzuur (Holanda); Ácido Diclorofenoxiacético; 2,4- Ácido Diclorofenoxiacético; 2,4-Dichlor-Phenoxy-Essigsaeure (Alemania); Dicopur; Dioweed; DMA 4; Esterone Tour; Esteron 44 Weed Killer; Estone; Farmco; Fernesta;

Fernimin; Fernoxone; Ferxone; Foredex 75; For-ester; Formola 40; Green Cross Weed-No-More "80"; Hedonal (The herbicide); Herbidal; Hivol-44.

**Nombre comercial, Formulación (%), Presentación:**

**Para uso Agrícola:** 2,4-D Ácido Técnico, 98.000, Polvo Técnico; 2,4-D Amina 480 SA, 49.600, Solución Acuosa; 2,4-D Amina 720 / Cicloamina / Agroamina, 81.000, Solución Concentrada Acuosa; 2,4-D Amina Atanor 48, 49.400, Líquido Miscible; 2,4-D Butil Ester Técnico, 98.500, Líquido Técnico; 2,4-D Ester 400 CE, 49.000, Concentrado Emulsionable; Dominante / Herbipol Matabrosas, 78.800, Concentrado Emulsionable; Herbipol Amina 600, 60.000, Solución Concentrada Acuosa; Kamikaze Técnico 98% Yerbisol / Aminex / Bramina / Yermina / Tacsamina, 49.500, Solución Concentrada Acuosa.

**Para uso Urbano:** Full-Mina 4 / Fórmula 48 / DMA 4, 49.600, Solución Concentrada Acuosa / Navajo / Sheriff, 95.000, Cristales Solubles

**Para uso Industrial:** 2,4-D Amina Premezcla Técnica, 51.500, Líquido Técnico

**Fórmula química:**  $C_8H_6Cl_2O_3$

**Peso molecular:** 221.04

**Tipo de plaguicida:** Herbicida

**Clasificación:** Clorofenoxi

**Uso:** Agrícola, industrial y urbano

**Presentaciones comerciales:** Agrícola: Para control de malezas: como concentrado emulsionable en equivalentes en gramos de ingrediente activo (I.A./kg o L) de: 400, 480, 720 y 800. Como cristales solubles en equivalentes en gramos de ingrediente activo (I.A./kg o L) de: 792. Como líquido miscible en equivalentes en

gramos de ingrediente activo (I.A./kg o L) de: 479. Como líquido soluble en equivalentes en gramos de ingrediente activo (I.A./kg o L) de: 455. Como polvo soluble en equivalentes en gramos de ingrediente activo (I.A./kg o L) de: 804 y 840. Como solución acuosa en equivalentes en gramos de ingrediente activo (I.A./kg o L) de: 393, 439, 455, 479, 480 y 720.

## **PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS**

Es un polvo cristalino blanco a amarillo, inodoro en estado puro. Se funde a los 138 °C. Su densidad relativa es de 1.42 a 25 °C (agua = 1). Es ligeramente soluble en agua (900 mg/l a 25 °C como ácido). Presenta las siguientes solubilidades: en acetona 67.3 g/400 ml a 25 °C, en benceno 0.94 g/100 ml a 28 °C, en disulfuro de carbono 0.63 g/100 ml a 29 °C, en tetracloruro de carbono 0.16 g/100 ml a 25 °C, en diesel y keroseno 0.08 g/100 ml a 25 °C, en dioxano 78.5 g/100 ml a 31 °C, en etanol al 50% 10.3 g/100 ml a 25 °C, en etanol al 95% 100 g/100 ml a 25 °C, en éter etílico 27.0 g/100 ml a 25 °C, en isopropanol 24.8 g/100 ml a 31 °C, en metil isobutil cetona 25 g/100 ml a 25 °C, en orto-diclorobenceno 0.52 g/100 ml a 25 °C y en tolueno 0.058 g/100 ml a 25 °C. Su presión de vapor es de  $8.25 \times 10^{-8}$  mm Hg a 20 °C ( $1.1 \times 10^{-2}$  mPa a 20 °C). Su Constante de la Ley de Henry es de  $8.6 \times 10^{-6}$  atm m<sup>3</sup>/mol a 20 °C. No es higroscópico, pero sí corrosivo. Esta sustancia al incendiarse produce gases venenosos que incluyen al cloruro de hidrógeno y al monóxido de carbono.

## **PELIGROSIDAD**

**Salud (Azul): 2** – Una exposición intensa o continua (pero no crónica) podría causar incapacidad temporal o posibles lesiones residuales, a menos de que se proporcione un rápido tratamiento médico.

**Inflamabilidad (Rojo): 1** – Debe ser precalentada para que ocurra el incendio.

**Riesgo de Explosión (Amarillo): 0** – Normalmente estable, incluso bajo condiciones de incendio y no es reactiva con el agua.

## **DESTINO EN EL AMBIENTE**

**Persistencia:** Poco persistente

El suelo y los cuerpos de agua son sus medios receptores directos, pero se dispersa en todos los compartimentos del ambiente. En el aire persiste por horas y puede ser eliminado por precipitación junto con la lluvia. En agua y suelo es degradado en poco tiempo (vida media menor de 7 días) por hidrólisis, fotólisis y por la acción de los microorganismos. Su movilidad en suelo varía de baja a moderada, por ello puede lixiviarse hasta las aguas subterráneas. La biodegradación de este compuesto generalmente dura varios meses dependiendo de las condiciones físicas, químicas  $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_4$  y de la aplicación previa de plaguicidas. Su bioconcentración en los organismos es baja. Puede ser absorbido por las plantas a través de hojas, tallos y raíces y posteriormente es transformado por distintas rutas metabólicas.

## **TOXICIDAD PARA LOS ORGANISMOS Y EL MEDIO AMBIENTE 01**

### **Tipo toxicológico: III**

En general es de ligera a moderadamente tóxico para organismos acuáticos y terrestres (aves, peces, ostras, cangrejos y camarones), sin embargo algunas formulaciones son muy tóxicas para peces. Reduce la capacidad de los microorganismos y algas para fijar el nitrógeno en suelo y agua. Cambia la composición de especies y la estructura de la vegetación, con los efectos consecuentes sobre los ecosistemas terrestres.

## **Anexo N° 07: DATOS DE IDENTIFICACIÓN DEL VITAVAX**

**PRODUCTO:** VITAVAX

**NOMBRE QUÍMICO:** THIRAM 37,5% + CARBOXIN 37,5%

**USO:** Fungicida curasemillas.

### **CLASIFICACIÓN DE RIESGOS:**

**Inflamabilidad:** No inflamable

**Clasificación toxicológica:** IV — CUIDADO

### **PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS:**

**Aspecto físico:** Polvo mojable

**Presión sin vapor:** 14 mm Hg

**Punto de fusión:** 346 °C

**Solubilidad en agua 20 °C:** Dispersable en agua

### **Primeros auxilios:**

**Inhalación:** Removeirse al aire, usar máscara adecuada.

**Piel:** Lavar con abundante agua y jabón.

**Ojos:** lavar durante 15 minutos con abundante agua.

**Ingestión:** Inducir al vómito con la persona conciente.

## **PELIGROSIDAD**

**Salud (Azul)**

**Inflamabilidad (Rojo)**

**Riesgo de Explosión (Amarillo)**

## **DESTINO EN EL AMBIENTE**

**Persistencia:** Poco persistente (2 a 8 semanas)

En la aire puede ser oxidado en su fase gaseosa mediante reacciones con radicales hidroxilo, con un tiempo de vida media de 1.7 horas, o puede ser removido por precipitación húmeda. En el suelo muestra una alta movilidad y se biodegrada bajo condiciones aeróbicas. Se volatiliza lentamente desde la superficie del agua o desde las superficies húmedas y secas del suelo. En los cuerpos de agua se adsorbe a los sólidos suspendidos y sedimentos (materia orgánica), y no se bioconcentra en los organismos acuáticos.

## **Anexo N° 06. GLOSARIO DE TÉRMINOS UTILIZADOS**

---

- ✚ **Aclimatación.-** Adaptación de un individuo a un clima diferente, o el ajuste de una especie o de una población a un ambiente distinto, después de varias generaciones.
- ✚ **Angiospermas.-** Clasificación taxonómica de las plantas o vegetales terrestres, cuya principal característica es que presentan flores verdaderas, se dividen en monocotiledóneas y dicotiledóneas.
- ✚ **Antioxidante.-** Compuesto químico que permite la captación de fenoles y polifenoles.
- ✚ **Ápice.-** Tejido meristemático que ocupa la parte terminal del tronco, raíces y ramas.
- ✚ **Apomixis.-** Producción de descendientes en las estructuras sexuales habituales, sin mezcla y segregación de cromosomas.
- ✚ **Biodiversidad.-** Conjunto de todas las especies de plantas y animales, su material genético y los ecosistemas de los que forman parte.
- ✚ **Biotecnología.-** Toda aplicación tecnológica que utilice sistemas biológicos y organismos vivos y sus derivados para la creación o modificación de productos o procesos en usos específicos.
- ✚ **Callogénesis.-** Proceso fisiológico que da origen a la formación de callos en una forma desordenada.
- ✚ **Callo.-** Tejido inicial formado por la división celular del explante, generalmente homogéneo, no diferenciado en tejido organizado.



- ✚ **Clon.-** Célula que posee carga genética idéntica a la célula madre. Grupo de plantas que se origina mediante propagación vegetativa a partir de una sola planta. Población de células u organismos de idéntico genotipo.
- ✚ **Cotiledones.-** Hojas o par de hojas primarias del embrión dentro de la semilla y, comúnmente, la primera o primeras en emerger en la germinación.
- ✚ **Dioico.-** Que tiene las flores estaminadas y pistiladas en plantas distintas de la misma especie.
- ✚ **Embriogénesis somática.-** Técnica de multiplicación clonal, que permite obtener embriones somáticos sin tener que pasarse por la reproducción sexual.
- ✚ **Embriode.-** Célula de óptimo desarrollo que permite la expresión de la totipotencialidad mediante la generación de un individuo.
- ✚ **Embrión.-** Planta rudimentaria dentro de una semilla, el embrión se origina a partir del cigote.
- ✚ **Endosperma.-** Tejido triploide, que procede de la fusión triple de un núcleo espermático, con el núcleo polar del saco embrionario. En las semillas de ciertas especies el endosperma persiste como tejido de almacenamiento de reservas, que se utilizan para el desarrollo del embrión y de la pequeña plántula durante la germinación.
- ✚ **Explante.-** Porción de tejido vegetal adquirido de cualquier parte de una planta.
- ✚ **Escarificación.-** Cualquier proceso de ruptura, rayado o alteración mecánica de las cubiertas de la semilla para hacerla permeable al agua o a los gases.

- ✚ **Explante.-** segmento de tejido u órgano vegetal utilizado para iniciar un cultivo *in vitro* (hojas, raíces, anteras, embriones, brotes, yemas, meristemas)
- ✚ **Hormona.-** Sustancias químicas de acción especializada que actúan como mensajeras, controlan tejidos y órganos situados en cualquier parte del organismo, en aquellas células que responden al estímulo que provocan.
- ✚ **In vitro.-** Literalmente, en vidrio, en tubos de ensayos para laboratorio, investigado y manipulado fuera del organismo vivo.
- ✚ **Lejía comercial.-** Solución desinfectante que contiene diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio.
- ✚ **Medio de cultivo.-** Compuesto enriquecido en sales macro y micro,, en adición de vitaminas, hormonas, antioxidantes proveen los requerimientos nutricionales para su desarrollo.
- ✚ **Organogénesis.-** Evento fisiológico que permite la generación de órganos a partir de un tejido.
- ✚ **Protocolo.-** Procedimiento sincronizado y ordenado de técnicas *In Vitro* para lograrse un objetivo.
- ✚ **Regeneración.-** Capacidad que expresan las células a la formación de nuevos individuos.
- ✚ **Regeneración directa.-** Ruta de la Embriogénesis somática que permite obtenerse nuevos individuos a partir de tejidos.
- ✚ **Regeneración indirecta.-** Una de las rutas de la Embriogénesis somática que permite la obtención de nuevos individuos a partir de la formación de callos.

- # **Semilla.-** Óvulo maduro con todas sus cubiertas normales. Una semilla consiste de su cubierta, embrión y en ciertas plantas, de un endosperma.
- # **Somático.-** Células diploides de los organismos.
- # **Totipotente.-** Capaz de todo. Se aplica a las células que pueden dar origen a células de todos los órdenes.
- # **Variación somaclonal.-** Variación observada en células somáticas que se dividen mitóticamente en cultivo de tejidos.